



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mario Kekez

**FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA
CITOSOLNE SERIL-tRNA-SINTETAZE IZ BILJKE
*Arabidopsis thaliana***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Mario Kekez

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF
CYTOSOLIC SERYL-tRNA SYNTHETASE
FROM PLANT *Arabidopsis thaliana***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Mario Kekez

**FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA CITOSOLNE
SERIL-*t*RNA-SINTETAZE
IZ BILJKE *Arabidopsis thaliana***

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2016.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Mario Kekez

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION
OF CYTOSOLIC SERYL-tRNA SYNTHETASE
FROM PLANT *Arabidopsis thaliana***

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Asst. Professor

Zagreb, 2016.

"We choose to go to the moon in this decade and do the other things, not because they are easy, but because they are hard, because that goal will serve to organize and measure the best of our energies and skills, because that challenge is one that we are willing to accept, one we are unwilling to postpone, and one which we intend to win, and the others, too."

John Fitzgerald Kennedy

..neizmjereno hvala profesorici Weygand-Đurašević na vjeri u mene i moj rad..mogućnosti da radim, učim i doktoriram

veliko hvala mentorici Jasmini Rokov Plavec na bezmjernoj pomoći i vremenu poklonjenom u utabavanje mog znanstvenog puta, idejama koje su mi pomogle da probleme gledam s one "druge strane"

ogromno hvala ljudima iz 312-estice i 301-inice, mojim diplomandima Marini, Eli i Vladimiru, te ostalim članovima ZBK-a na znanstvenom i radnom suživotu, savjetima, pomoći, idejama bez kojih bi sve bilo mnogo teže..hvala Nataši na biljarskoj pomoći i uvijek pozitivnoj energiji..hvala SPR-ovcima Vesni i Gregoru na gostoprimstvu, odličnoj atmosferi i dobrim rezultatima..hvala Elodie i IBMP-ovcima, a posebno Anne-Marie na susretljivosti, toplini i prijateljstvu kilometrima daleko od doma

hvala Ani na razgovorima "s terase", idejama i zamahu bez kojih bi vrijednost ovog doktorata zasigurno bila mnogo manja..napokon hvala na bezrezervnom prijateljstvu

hvala Maji na PBK-ovskom i životnom razumijevanju, neprocjenjivoj potpori i prijateljstvu

hvala Zvonimiru koji je uvijek vjerovao u mene (čak i kada ni ja sam nisam) i iskreno se radovao svim mojim uspjesima

hvala sestri Jadranki, Goranu K., Tihomiru, Toniju, Domagoju, Darku i Sandi..koji su uvijek bili tu negdje i svatko na svoj način olakšavali moje jedrenje kroz doktorske vode

hvala Ivani koja nije odustajala pokazati mi kako je moguće drugačije, hvala na toplini i podršci

na kraju nemjerljivo hvala mojim roditeljima Štefaniji i Ivanu bez čijeg odricanja, brizi i neupitne potpore ne bi bilo moguće moje školovanje..

Sadržaj

SAŽETAK.....	XV
ABSTRACT	XVII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze.....	3
2.2. Seril-tRNA-sintetaze	6
2.1.1. Seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa	10
2.3. Proteinske interakcije aminoacil-tRNA-sintetaza.....	12
2.4. Lokalizacija aminoacil-tRNA-sintetaza u stanici.....	17
2.5. Abiotički stres i biljne aminoacil-tRNA-sintetaze	20
§ 3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Standardne kemikalije.....	23
3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi.....	24
3.1.3. Boje.....	24
3.1.4. Enzimi i ostali proteini.....	24
3.1.5. Hranjive podloge.....	25
3.1.5.1. Hranjive podloge za bakterije	25
3.1.5.2. Hranjive podloge za kvasce.....	25
3.1.5.3. Hranjive podloge za biljke.....	26
3.1.6. Kromatografske kemikalije, kolone, membrane i filmovi	26
3.1.7. Komercijalni kompleti.....	26
3.1.8. Markeri veličine	27
3.1.9. Radioaktivno obilježeni spojevi.....	27
3.1.10. Spojevi i plazmidi	27
3.1.10.1. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.10.2. Kvasac <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
3.1.10.3. Biljka <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.1.10.4. Biljka <i>Allium cepa</i>	30
3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama.....	32
3.2.1. Izolacija plazmidne DNA.....	32
3.2.2. Izolacija mRNA.....	34

3.2.3. Elektroforeza nukleinskih kiselina na gelu agaroze	35
3.2.4. Transformacija bakterijskih stanica.....	36
3.2.5. Transformacija stanica kvasca	36
3.2.6. Transformacija biljnih stanica	37
3.2.6.1. Transformacija biljnih stanica bombardiranjem mikroprojektilima.....	37
3.2.6.2. Transformacija protoplasta.....	38
3.2.7. Lančana reakcija polimeraze.....	39
3.2.7.1. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze.....	42
3.2.8. Restriksijske endonukleaze.....	43
3.2.9. Ligacija	44
3.2.10. Gateway kloniranje	45
3.2.11. Sekvenciranje nukleotidnih sljedova	46
3.2.12. DNazni tretman	47
3.2.13. Reakcija reverzne transkriptaze	47
3.3. Metode rada s proteinima	48
3.3.1. SDS-poliakrilamidna elektroforeza.....	48
3.3.2. Nadekspresija proteina od interesa	49
3.3.3. Homogenizacija stanica.....	50
3.3.4. Kromatografsko pročišćavanje proteina.....	51
3.3.4.1. Afinitetna kromatografija	51
3.3.4.2. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija.....	52
3.3.4.3. Gel-filtracija	53
3.3.5. Ultrafiltracija.....	53
3.3.6. Određivanje koncentracije proteina	54
3.3.7. Regeneracija proteina iz inkluzijskih tijela.....	54
3.3.8. Kinetičke analize.....	55
3.3.8.1. Određivanje aminoacilacijske aktivnosti SerRS.....	55
3.3.8.2. Određivanje kinetičkih parametara K_M i k_{cat}	56
3.3.9. Western-hibridizacijska analiza.....	56
3.3.10. Modeliranje trodimenzionalne strukture proteina	58
3.4. Proteinske interakcije	58
3.4.1. Kvašćev sustav dvaju hibrida.....	58
3.4.1.1. X-gal filter test.....	62
3.4.2. Metoda afinitetnog supročišćavanja spregnuta spektrometrijom masa.....	62
3.4.3. Metoda rezonancije površinskih plazmona.....	65
3.4.4. Mikrotermoforeza.....	67

3.5. Mikroskopska analiza.....	69
3.6. Priprema sjemena, uzgoj biljaka i analiza utjecaja abiotičkih stresora	69
§ 4. REZULTATI	71
4.1. Enzimska aktivnost SerRS proteina.....	71
4.1.1. Određivanje aminoacilacijske aktivnosti različitih varijanti enzima SerRS.....	73
4.1.2. Određivanje kinetičkih parametara	75
4.2. Identifikacija proteinskih interaktora SerRS metodom Y2H.....	76
4.3. Biofizička analiza interakcije SerRS i BEN1	81
4.3.1. Analiza interakcije BEN1 i SerRS metodom rezonancije površinskih plazmona.....	84
4.3.2. Analiza interakcije BEN1 i SerRS mikrotermoforezom.....	85
4.3.3. Određivanje interakcijskih domena proteina BEN1 i SerRS u kompleksu BEN1:SerRS.....	86
4.4. Identifikacija interaktora SerRS metodom TAP-MS	96
4.5. Lokalizacija SerRS u stanici	99
4.5.1. Fluorescencijska mikroskopska analiza.....	102
4.5.2. Konfokalna mikroskopska analiza	103
4.6. Uloga SerRS u abiotičkom stresu	106
4.6.1. Morfološke analize.....	107
4.6.2. Ekspresijske analize	108
§ 5. RASPRAVA	112
5.1. Aktivnost i specifičnost prepoznavanja supstrata SerRS enzima.....	112
5.2. Proteinske interakcije SerRS	114
5.3. Lokalizacija citosolne SerRS u biljnoj stanici	118
5.4. Stresni utjecaj okoline i SerRS.....	120
§ 6. ZAKLJUČAK	122
§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	124
§ 8. LITERATURNI IZVORI.....	126
§ 9. ŽIVOTOPIS	XIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA CITOSOLNE SERIL-tRNA-SINTETAZE IZ BILJKE *Arabidopsis thaliana*

Mario Kekez
Horvatovac 102a, Zagreb

Osnovna zadaća seril-tRNA-sintetaze (SerRS) je vezanje serina na tRNA^{Ser} pripremajući tako podlogu za biosintezu proteina. U ovom radu pokazano je kako citosolna SerRS iz biljke uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh) ostvaruje i nekanonske funkcije ulazeći u dosad nepoznatu interakciju s proteinom BEN1 koji sudjeluje u metabolizmu brasinosteroida, spojeva koji među ostalim sudjeluju u moderiranju staničnog odgovora na stres što potencijalno uključuje SerRS u stanični odgovor na stres. Nadalje, pokazano je *in vitro* kako istraživana SerRS gotovo jednako učinkovito aminoacilira bakterijske i eukariotske tRNA^{Ser} supstrate. S obzirom da je slično ponašanje uočeno i za kukuruznu SerRS, izgleda da biljne SerRS pokazuju neobično široku tRNA^{Ser} specifičnost, za razliku od SerRS iz drugih organizama. Lokalizacijski eksperimenti u uvjetima stabilne transformacije u transgeničnim biljkama *A. thaliana* nisu pokazali prisutnost SerRS u jezgri stanice, dok se u uvjetima tranzijentne transformacije SerRS u jezgrama protoplasta biljke *A. thaliana* pronalazi u 10-20% slučajeva. Konačno, utvrđena je statistički značajna razlika u duljini korijena transgeničnih biljaka *A. thaliana* koje nadeksprimiraju SerRS u odnosu na divlji tip u abiotičkom stresu izazvanom ionskim i osmotskim stresorima, te kadmijskim kada su biljke kontinuirano uzgajane na podlogama s navedenim stresorima.

(132 stranice, 45 slika, 13 tablica, 137 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: *Arabidopsis thaliana* / abiotički stres / proteinske interakcije / seril-tRNA-sintetaza / stanična lokalizacija

Mentor: Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
Doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
Dr. sc. Branka Salopek-Sondi

Rad prihvaćen: 18.12.2015.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF CYTOSOLIC SERYL-tRNA SYNTHETASE FROM PLANT *Arabidopsis thaliana*

Mario Kekez
Horvatovac 102a, Zagreb

Primary function of seryl-tRNA synthetase (SerRS) is attachment of serine to tRNA^{Ser} preparing a foundation for successful protein biosynthesis. It is shown in this dissertation that cytosolic SerRS from plant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, also performs non-canonical functions by establishing so far the unknown interaction with protein BEN1 which is involved in metabolism of brassinosteroids, compounds important in cell stress response what potentially implicates involvement of SerRS in cell stress response. Furthermore, *in vitro* experiments showed that SerRS almost equally well catalyzes aminoacylation of bacterial and eukaryotic tRNA^{Ser} substrates. Given the fact that the same behaviour was previously shown for monocot maize SerRS, it seems that plant SerRSs exhibit unusually broad tRNA^{Ser} specificity, unlike SerRSs from other organisms. Localization experiments under conditions of stable transformation in transgenic *A. thaliana* plants did not detect SerRS in the cell nucleus. Under transient transformation of *A. thaliana* protoplasts SerRS was detected in cell nucleus in 10-20 % of calls. Finally, statistically significant difference in root length of transgenic *A. thaliana* plants overexpressing SerRS in comparison with wild type was found under conditions of abiotic stress caused by ionic and osmotic stressors and cadmium in plants grown continuously on stress growth medium.

(132 pages, 45 figures, 13 tables, 137 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: *A. thaliana* / abiotic stress / cellular localization / protein-protein interaction / seryl-tRNA-synthetase

Supervisor: Dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Profesor

Reviewers: Dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović, Associate Professor
Dr. sc. Jasmina Rokov Plavec, Assistant Professor
Dr. sc. Branka Salopek-Sondi, Assistant Professor

Thesis accepted: 18.12.2015.

§ 1. UVOD

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) primarno kataliziraju reakciju aminoacilacije vezanjem pripadne aminokiseline s odgovarajućom molekulom tRNA pripremajući na taj način podlogu za proces translacije. Zbog ove važne uloge u biosintezi proteina pojava aaRS dogodila se vrlo rano u evolucijskoj prošlosti. Tijekom vremena katalitičkoj srži enzima dodavane su nove funkcijske domene, te su aaRS uz visoko očuvanu aminoacilacijsku kanonsku funkciju počele obavljati i nove netranslacijske nekanonske uloge. Ostvarivanje svoje biokemijske funkcije proteini mogu realizirati samostalno ili često u interakciji s drugim proteinima u stanici što dovodi do pojave novih svojstava na razini organizma. Istraživanje interaktoma ili mreže proteina u stanici daje uvid u fiziološku složenost organizma i podlogu za razumijevanje bioloških procesa. Nekanonske funkcije aaRS samostalno ili u interakciji s drugim proteinima zapažene su u staničnoj signalizaciji, odgovoru stanice na stres, imunološkom odgovoru, apoptozi, angiogenezi, sklapanju virusnih čestica i kontroli transkripcije.^{1,2}

Zbog svoje katalitičke uloge u pripremi translacije aaRS su prisutne u mitohondrijima i citosolu eukariotske stanice, te dodatno i u kloroplastima biljne stanice. Neke aaRS posjeduju specifične nuklearne lokalizacijske signale što im omogućuje da pod određenim uvjetima posredstvom importina ulaze u jezgru stanice i tamo sudjeluju u provjeri novo sintetizirane tRNA u tzv. *korektivnoj* aminoacilaciji prije njenog izlaska u citoplazmu,³ sintezi ribosomskih RNA molekula,⁴ regulaciji angiogeneze putem regulacije transkripcije gena vaskularnog endotelnog faktora rasta A⁵ i drugo.

Stresni ambijent izaziva kompleksan biokemijski odgovor stanice koji se temelji na mobilizaciji niza biokemijskih puteva. AaRS mogu sudjelovati u staničnom odgovoru na stres posredno sintezom molekula drugih glasnika, tzv. alarmona, tako da intermedijarni produkt aminoacilacije aminoacil-adenilat (prethodno ATP-om aktivirana aminokiselina) ne reagira s tRNA, nego s ATP-om, te nastaju oligofosfatni spojevi (Ap_nA) koji dalje djeluju kao aktivatori staničnih signalnih kaskada. Iako u eukariotskim stanicama nije jasno razlučena uloga alarmona, poznato je da se u bakterijama oni vežu na proteine oksidativnog stresa.⁶ Direktne uloge aaRS u obrambenim mehanizmima stanice u stresu do sada nisu razjašnjene,

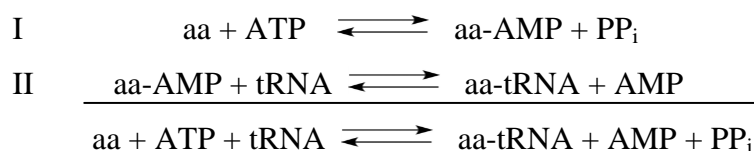
iako je poznato kako pojedini stresori mogu utjecati na aktivnost, odnosno disregulaciju koncentracije pojedinih aaRS.⁷⁻⁹

Cilj ovog rada usmjeren je na otkrivanje i karakterizaciju proteinskih interakcijskih partnera citosolne seril-tRNA-sintetaze (SerRS) iz biljke *Arabidopsis thaliana*, određivanje lokalizacije ovog enzima u stanici, te utvrđivanje njegove povezanosti s fenotipskim promjenama u biljkama koje ga nadeksprimiraju na podlogama bez stresora i s dodanim abiotičkim stresorima. S obzirom da je relativno mali broj istraživanja usmjeren prema biljnim aaRS, pa tako i SerRS, ovaj rad služi detaljnijoj karakterizaciji translacijskih i netranslacijskih funkcija biljnih aaRS na primjeru SerRS. Hipoteze ovog rada su da SerRS interagira s drugim proteinima u stanici, te da sudjeluje u staničnim odgovorima na stres. Detekcija proteinskih interakcija bit će provedena korištenjem kvašćevog sustava dvaju hibrida u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (s unaprijed pripremljenim knjižnicama cDNA iz biljke *A. thaliana*), te metodom tandemskog afinitetnog supročišćavanja proteina iz transgenične biljke *A. thaliana* koja nadeksprimira SerRS. Identifikacija potencijalnih proteinskih partnera SerRS bit će napravljena sekvenciranjem DNA u metodi dvaju kvašćevih hibrida, odnosno spektrometrijom masa u metodi tandemskog afinitetnog supročišćavanja. Potvrđivanje proteinskih interakcija uočenih *in vivo* vršit će se metodom mikrotermoforeze i metodom rezonancije površinskih plazmona. Stanična lokalizacija SerRS fuzionirane sa zelenim fluorescentnim proteinom (eng. *green fluorescent protein*, GFP) odredit će se upotrebom fluorescencijske i konfokalne mikroskopije na korijenju i protoplastima biljke *A. thaliana*, kao i na tkivu luka *Allium cepa*. U svrhu istraživanja razlika između transgeničnih biljaka koje prekomjerno eksprimiraju citosolnu SerRS i biljaka divljeg tipa biljke *A. thaliana* u stanju abiotičkog stresa pratit će se fenotipske promjene (klijavost, duljina korijena, morfologija) na hranjivim podlogama u koje su dodani različiti stresori (ionski, osmotski i teški metali). Analiza genske ekspresije SerRS i drugih gena od interesa u biljkama *A. thaliana* divljeg tipa i transgeničnim biljkama koje nadeksprimiraju SerRS na podlogama bez stresora i na podlogama s dodanim abiotičkim stresorima bit će napravljena kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Aminoacil-tRNA-sintetaze

Aminoacil-tRNA-sintetaze (aaRS) su enzimi koji sudjeluju u pripremi biosinteze proteina katalizirajući vezanje odgovarajuće aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA. Prvi korak reakcije predstavlja nukleofilni napad karboksilne skupine aminokiseline na α -atom fosfora molekule ATP-a pri čemu nastaje aminoacil-adenilat (aa-AMP) i anorganski pirofosfat (PP_i). U drugom koraku reakcije kisik 2'- ili 3'-hidroksilne skupine riboze krajnjeg adenzina na 3'-kraju molekule tRNA nukleofilno napada anhidridni ugljikov atom aminoacil-adenilata uz nastajanje aminoacil-tRNA i AMP-a:¹⁰



Radi lakšeg pregleda u tekstu će aaRS biti označavane oznakama sastavljenim od troslovnih kratica aminokiseline s nastavkom RS (npr. seril-tRNA-sintetaza, SerRS). S obzirom na sekvencijske i strukturne značajke, te kemizam aminoaciliranja, aaRS su podijeljene u dva zasebna razreda: GlnRS, TyrRS, MetRS, GluRS, ArgRS, ValRS, IleRS, LeuRS, TrpRS, CysRS i LysRS čine razred I, dok AlaRS, AspRS, AsnRS, GlyRS, HisRS, LysRS, PheRS, ProRS, SerRS i ThrRS čine razred II.^{11,12} Primjer "dijeljenja" aaRS između razreda prvi puta je otkriven na primjeru LysRS razreda I u arheji *Methanococcus maripaludis*.¹³ Otprije poznati oblici LysRS razreda II prevladavaju u eukariotima, većini bakterija i tek rijetko u arhejama (rod *Sulfolobus* i *Pyrobaculum*),¹⁴ dok su porijeklom i strukturno drugačiji oblici LysRS razreda I nađeni u arhejama i tek malom broju bakterija.¹⁵ AaRS razreda I koriste za aminoaciliranje 2'-hidroksilnu skupinu terminalnog adenzina, posjeduju Rossmannov nabor za vezanje nukleotida koji sadrži visoko specifične aminokiselinske motive HIGH (His-Ile-Gly-His) i KMSKS (Lys-Met-Ser-Lys-Ser), te su uglavnom monomeri. AaRS razreda II aminoaciliranje provode preko 3'-hidroksilne skupine, a javljaju se kao dimeri ili multimerni proteini.¹⁶

Tijekom evolucijske prošlosti katalitička srž aaRS strukturno je obogaćivana dodatnim domenama i motivima čime je povećana funkcijska širina ovih enzima, ne samo u pripremi translacije: omogućavanju boljeg prepoznavanja pripadnih molekula tRNA¹⁷ i ispravljanju pogrešnog povezivanja aminokiselina i molekula tRNA;¹⁸ već i u ostvarivanju drugih nekanonskih funkcija. Tako primjerice aaRS zbog novih funkcija u staničnoj signalizaciji i svojoj uključenosti u (pato)fiziološke procese postaju biomedicinski zanimljive kao potencijalne farmakološke mete u novim terapijama. Uloga aaRS kao moderatora upale zapažena je na primjeru humanih HisRS, AsnRS, TyrRS i SerRS. Pokazano je kako humani HisRS i AsnRS sudjeluju u generiranju upalnog odgovora vezanjem na kemokinske receptore određenih vrsta leukocita (limfocita, aktiviranih monocita i nezrelih dendritičnih stanica) kemotaktički ih usmjeravajući prema žarištu upale.¹⁹ Osim toga, u proteomičkim istraživanjima humanih proosteoblasta u kulturi stanica tretiranih fibroblastnim faktorom rasta 2 (eng. *fibroblast growth factor 2*, *FGF2*) utvrđena je značajna nadekspresija humane AsnRS (čak 900 puta). Povećana koncentracija AsnRS kao medijatora signalnog puta FGF2 pogodovala je proliferaciji stanica, dok je utišavanje ekspresije izazvalo apoptozu. Mehanizam zaštitnog anti-apoptotičnog djelovanja AsnRS nije poznat, no temelji se na aktivaciji izuzetno važnog staničnog signalnog puta PI3K/Akt.²⁰ Pojačavanje učinka apoptoze zabilježeno je kod humane TyrRS u pokusima sa staničnim kulturama. TyrRS viših eukariota na svom C-kraju sadrži dodatnu domenu koja dijeli 51 % sličnosti u sekvenci s proupalnim citokinom EMAP II (eng. *human endothelial monocyte-activating polypeptide II*).²¹ U stanju apoptoze TyrRS se ekstracelularno izlučuje i djelovanjem proteaze leukocitne elastaze fragmentira, pri čemu dio s domenom koja sliči polipeptidu EMAP II izaziva kemotaksiju leukocita, te stimulira sintezu tkivnih faktora, upalnih proteina: mijeloperoksidaze, odnosno TNF- α (eng. *tumor necrosis factor α*). Preostali fragment tzv. *mini-TyrRS* posjeduje ELR (Glu-Leu-Arg) motiv koji mu omogućuje proupalno kemotaktično i proangiogeno djelovanje.²² Antagonistično angiostatsko djelovanje uočeno je kod *mini-TrpRS*, izoforme humane TrpRS nastale alternativnim prekrajanjem mRNA ili proteolitičkim cijepanjem cjelovite TrpRS pod utjecajem γ -interferona.²³ Mini-TrpRS sadrži specifični aminokiselinski motiv WHEP, te inhibira *in vitro* i *in vivo* angiogenezu induciranu citokinom VEGF-om (eng. *vascular endothelial growth factor*).²⁴ Humana SerRS svoje nekanonsko djelovanje može poput AsnRS i HisRS ispoljavati kao proupalni citokin,¹⁹ no zanimljiva je i njena uključenost u angiogenezu preko supresije transkripcije gena *vegfa* koji kodira citokin VEGF A (eng.

vascular endothelial growth factor A). U eksperimentima *in vivo* pripremljeni su mutanti embrija vrste *Danio rerio* koji ne ekspimiraju funkcionalni SerRS, te pokazuju povećanu ekspresiju *vegfa* i značajne vaskularne defekte. Ubrizgavanjem katalitički neaktivne forme SerRS-a u embrije čime bi se promatrao samo potencijalni nekanonski utjecaj, postignuta je restauracija normalnog vaskularnog razvoja i smanjenje razine ekspresije *vegfa*.²⁵ Nadalje, u eksperimentima utišavanja gena pomoću siRNA za SerRS u kulturi humanih endotelnih stanica iz vene pupčane vrpce primijećene su defektne promjene u angiogenezi kao dodatna potvrda nekanonske regulacijske funkcije u vaskularnom razvoju organizama.²⁶

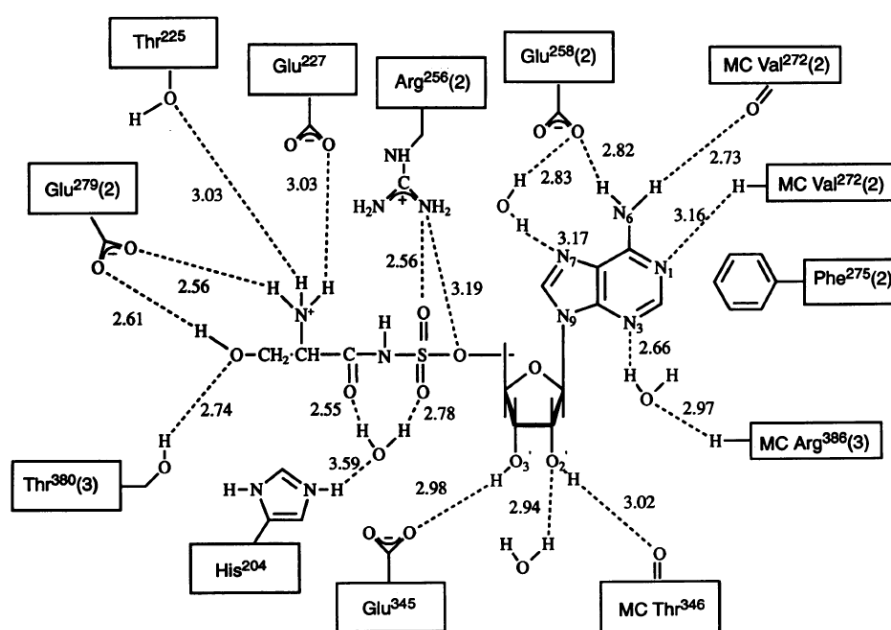
Tablica 1. Pregled dodatnih domena aaRS iz različitih organizama (prilagođeno prema²).

aaRS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Homo sapiens</i>
CysRS	UNE-C ₁ i UNE-C ₂	UNE-C ₁ i UNE-C ₂	UNE-C ₁ i UNE-C ₂	UNE-C ₁ i UNE-C ₂	UNE-C ₁ , UNE-C ₂ i GST
GlnRS	UNE-Q	UNE-Q	UNE-Q	UNE-Q	UNE-Q
ArgRS		LZ	LZ	LZ	LZ
MetRS	GST	GST, LZ i EMAPII	GST i WHEP	GST i WHEP	GST i WHEP
ValRS				GST	GST
LeuRS		UNE-L	UNE-L	UNE-L	UNE-L
IleRS				UNE-I	UNE-I
TrpRS				WHEP	WHEP
TyrRS			ELR i EMAPII	ELR i EMAPII	ELR i EMAPII
GluRS	GST	GST i WHEP	GST i WHEPs	GST i WHEPs	GST i WHEPs
ProRS		WHEP			
HisRS		WHEP	WHEP	WHEP	WHEP
PheRS	UNE-F	UNE-F	UNE-F	UNE-F	UNE-F
AspRS	N-zavojnica	N-zavojnica	N-zavojnica	N-zavojnica	N-zavojnica
LysRS	N-zavojnica	N-zavojnica	N-zavojnica	N-zavojnica	N-zavojnica
AsnRS	UNE-N	UNE-N	UNE-N	UNE-N	UNE-N
ThrRS	UNE-T	UNE-T	UNE-T	UNE-T	UNE-T
SerRS				UNE-S	UNE-S
GlyRS		WHEP	WHEP	WHEP	WHEP
MSC p18			GST	GST	GST
MSC p38			LZ i GST	LZ i GST	LZ i GST
MSC p43			LZ i EMAPII	LZ i EMAPII	LZ i EMAPII

GST (glutation-S-transferazna domena), LZ (leucinski zatvarač), MSC (multi-aaRS kompleks (eng. *multi-aaRS complex*)), UNE (jedinstvena nepoznata domena (eng. *unique unfamiliar domain*))- za svaku korištenu aminokiselinu dodana je jednoslovna kratica

2.2. Seril-tRNA-sintetaze

Rješavanjem kristalne strukture SerRS iz bakterije *Escherichia coli*¹¹ po prvi puta je dobiven uvid u prostornu organizaciju enzima aaRS razreda II. SerRS iz *E. coli* sastavljena je od N-terminalne domene dugačke 60 Å tzv. uzvojite zavoynice (eng. *coiled-coil*) koju tvore dvije dugačke antiparalelne α -zavoynice, i katalitičke domene u kojoj sedmerostrana antiparalelna β -ploča okružena α -uzvoynicama tvori aktivno mjesto enzima. U katalitičkoj domeni događa se prijenos aktiviranog serina na tRNA^{Ser} za potrebe translacije, odnosno tRNA^{Sec} kao dio procesa ugradnje selenocisteina (Sec), 21. proteogene aminokiseline, u proteine.²⁷ Arhitektura aktivnog mjesta uključuje degenerirane aminokiselinske motive 1, 2 i 3 karakteristične za razred II aaRS.¹² Motiv 1 dio je kontaktne površine između dva monomera u homodimernoj strukturi, motiv 2 sudjeluje u pozicioniranju malih liganada i 3'-kraja molekule tRNA, dok motiv 3 veže ATP važan za aktivaciju aminokiseline. Arhitektura aktivnog mjesta katalitičke domene SerRS sa supstratom precizno je utvrđena analizama kristalnih struktura kompleksa SerRS iz bakterije *Thermus thermophilus* s analozima intermedijarnih produkata aminoacilacije koji djeluju inhibicijski na aminoacilacijsku aktivnost SerRS: serin-hidroksatom (SerHX, $^+\text{H}_3\text{N-HCR-CO-N(H)OH}$, R predstavlja bočni ogranak) i 5'-O-[N-(L-seril)-sulfamoi]adenozinom (Ser-AMS).²⁸

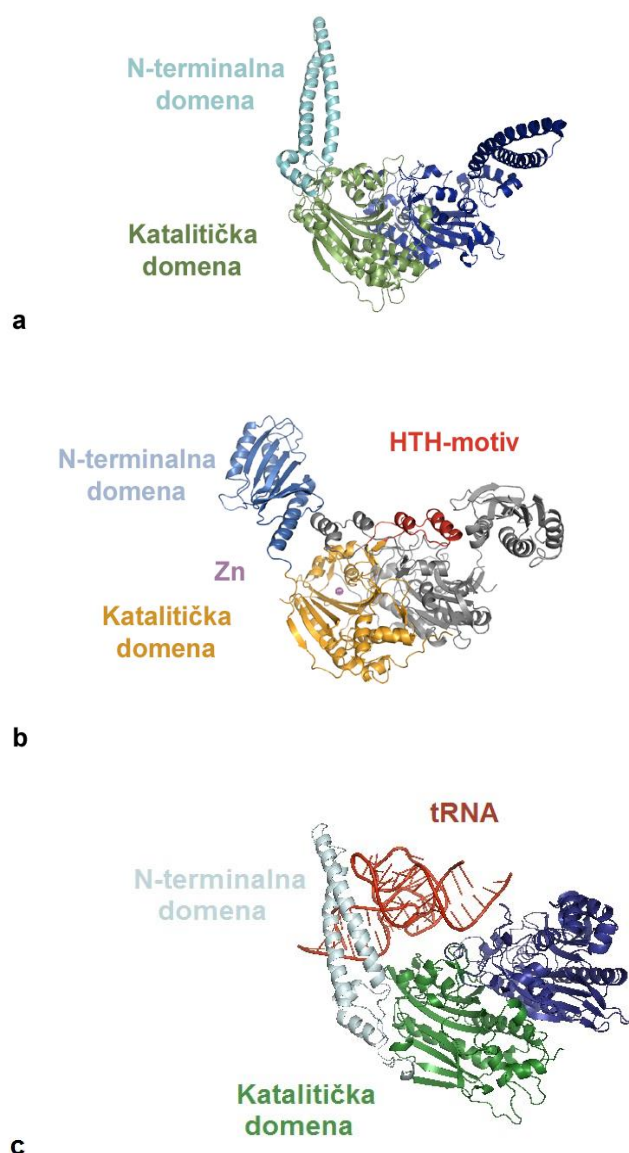


Slika 1. Dijagram polarnih interakcija vodikovih veza između analoga Ser-AMS i aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu SerRS. Označene su aminokiseline strukturnih motiva 2 i 3 (preuzeto iz ²⁸).

SerHX detektiran je u kristalnoj strukturi kao aktivirani oblik s vezanim AMP-om (SerHX-AMP). Razlika u strukturama analoga očituje se u različitoj duljini veze između fosfatne skupine (SerHX-AMP), odnosno sulfamoilne skupine (Ser-AMS) i aminokiseline. Pozicioniranje oba analoga u aktivnom mjestu vrlo je slično, razlikuje se samo po smještaju određenih molekula vode u zoni različitih funkcionalnih skupina (fosfatne, odnosno sulfamoilne skupine) i uspostavi dodatne vodikove veze između karbonilne skupine SerHX-AMP i Thr225 SerRS-a, dok pozicije serina i adenzina ostaju očuvane. U nastavku će biti opisano pozicioniranje Ser-AMS u aktivnom mjestu, a služi shvaćanju općeg principa smještanja aminokiselinskog supstrata u aktivno mjesto SerRS, odnosno aaRS razreda II. U slučaju Ser-AMS, adenzin je smješten tako da purinskim prstenom naliježe na Phe275 (motiv 2) uspostavljajući preko molekule vode Van der Waalsov kontakt s Arg386 (motiv 3). Specifičnost pozicioniranja temelji se na uspostavi vodikovih veza adenozinskih atoma dušika s okolnim molekulama vode (slika 1.) i Val272 (motiv 2). 2'-hidroksilna skupina riboze uspostavlja vodikovu vezu s karbonilnom skupinom Thr346, odnosno molekulom vode, dok se 3'-hidroksilna skupina vodikovom vezom povezuje s karboksilnom skupinom Glu345. Serinski ostatak povezuje se vodikovim vezama preko hidroksilne skupine bočnog ogranka s Thr380 u motivu 3 (ova pozicija nije potpuno konzervirana, budući da se kod *E. coli* vodikove veze uspostavljaju preko Ser391) i Glu279 (motiv 2), odnosno preko α -amino skupine vodikovim vezama s Glu227, Thr225 i Glu279 (motiv 2). Visoka specifičnost vezanja serina u aktivnom mjestu postignuta je veličinom serinskog veznog džepa koja ne dopušta ulazak aminokiselinama dužih bočnih ogranka, pa su jedine aminokiseline koje bi mogle "stati" u vezno mjesto treonin, alanin i glicin. Nadalje, specifičnost vezanja također ovisi i o mogućnosti uspostave dovoljnog broja vodikovih veza čime su dalje eliminirani glicin i alanin, dok treonin prema modelu vezanja koji predlažu Belrhali i suradnici (1994)²⁸ nije u mogućnosti ostvariti odgovarajuće vodikove veze zbog hidrofilnog ometanja od strane Ser348 i Asn378. Dvostrukom zaštitom aktivnog mjesta od vezanja krive aminokiseline uklonjena je potreba SerRS-a za dodatnim domenama koje bi korigirale potencijalnu misacilaciju, kao što je to slučaj kod nekih drugih aaRS.

N-terminalna domena SerRS (slika 2a.) služi prihvaćanju i prepoznavanju pripadne tRNA^{Ser}, te njena djelomična ili opsežna delecija značajno narušava drugi korak aminoacilacijske reakcije. U eksperimentima s *E. coli* SerRS²⁹ i enzim kojemu je uklonjena skoro cijela N-

terminalna domena (SerRS $\Delta 35-97$) i enzim kojemu nedostaje 16 središnjih aminokiselina u N-terminalnoj domeni (SerRS $\Delta 56-72$) su prije svega izgubili specifičnost prepoznavanja tRNA^{Ser}. Prvi korak aminoacilacije -aktivacija serina u aktivnom mjestu ostao je netaknut, no prijenos aktivirane aminokiseline na tRNA značajno je usporen što je vidljivo iz smanjenja vrijednosti obrtnih brojeva. Kod enzima bez cijele N-terminalne domene stagnacija aminoacilacijske aktivnosti zabilježena je u odnosu na divlji tip kroz povećanje vrijednosti Michaelisove konstante (K_M) za 30 puta, smanjenje vrijednosti obrtnog broja (k_{cat}) čak 1 000 puta, odnosno smanjenje aminoacilacijske specifičnosti k_{cat} / K_M za red veličine 10^4 (druga manje skraćena verzija enzima pokazala je slične, no iako blaže, ali još uvijek značajne promjene kinetičkih parametara). S druge strane, smanjenje aminoacilacijske specifičnosti za $3,5 \times 10^3$ puta izazvala je i zamjena *E. coli* tRNA^{Ser} mutiranom verzijom tRNA^{Ser} s kratkom varijabilnom omčom tipa 1³⁰ što određuje strukturni motiv varijabilne omče na tRNA^{Ser} kao mjesto prepoznavanja i interakcije sa zavojitom uzvojnicom SerRS (iznimke su mitohondrijske tRNA^{Ser} sisavaca koje strukturno značajno odstupaju od uobičajnog strukturnog obrasca tRNA molekula³¹). Ovim se SerRS izdvaja kao enzim koji za prepoznavanje tRNA ne koristi antikodonsku, već varijabilnu omču. Sekundarna struktura molekula tRNA karakterizirana je strukturnim motivima peteljki i omči: T Ψ C, D, varijabilna i antikodonska. S obzirom na duljinu varijabilne omče molekule tRNA se dijele na one tipa 1 koje sadrže kratke omče (4-5 nukleotida) i one tipa 2 s dužim varijabilnim omčama (10 nukleotida i više). tRNA^{Ser} jedna je od tri vrste molekula tRNA (preostale su tRNA^{Leu} i tRNA^{Tyr}) tipa 2 pronađenih u prokariotima, mitohondrijima i kloroplastima nižih eukariota, te uz tRNA^{Leu} jedina takva tRNA u eukariota i arheja. Rješavanjem kristalne strukture kompleksa SerRS:tRNA^{Ser} ³² iz bakterije *T. thermophilus* uočeno je da je na homodimer enzima uzduž obje podjedinice vezana samo jedna molekula tRNA^{Ser}. Vidljivo je kako se interakcija ostvaruje preko varijabilne omče, te dijelom T Ψ C omče što sve zajedno stabilizira inače fleksibilnu antiparalelnu zavojitu uzvojnici N-kraja SerRS i gura akceptorsku peteljku tRNA u aktivno mjesto nasuprotne podjedinice homodimera. Specifično prepoznavanje manje je vezano uz sekvencijske motive, koliko uz duljinu varijabilne omče. Ovdje zapažena stehiometrija vezanja tRNA^{Ser} na SerRS u omjeru 1:1 uočena je i u kristalnoj strukturi ternarnog kompleksa SerRS:tRNA^{Ser}:Ser-AMS³³ iz bakterije *T. thermophilus*, no nije jedini mogući množinski događaj interakcije. Godine 1993. riješena je kristalna struktura *E. coli* SerRS u kompleksu s dvije molekule tRNA^{Ser}, ³⁴ a 1994. godine Borel i suradnici su



Slika 2. Prikaz kristalnih struktura dimera SerRS iz (a) bakterije *Thermus thermophilus* (PDB oznaka: 1SRY, prema⁴³) i (b) metanogene arheje *Methanosarcina barkeri* (PDB oznaka: 2CJ9, prema⁴²), te kristalne strukture kompleksa dimera SerRS i molekule tRNA^{Ser} (c) iz bakterije *T. thermophilus* (PDB oznaka: 1SER, prema³²). Različite domene na monomerima označene su različitim bojama, a lako su uočljive i specifične značajke SerRS metanogenog tipa u odnosu na bakterijski tip (HTH-motiv, značajno veća N-terminalna domena i atom cinka u aktivnom mjestu enzima).

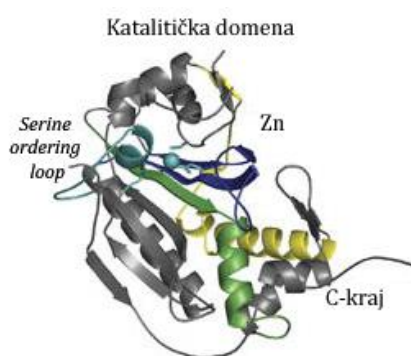
primjenom zonske interferencijske elektroforeze dokumentirali postojanje SerRS iz bakterije *E. coli* s dvije, odnosno jednom molekulom tRNA^{Ser} u kompleksu²⁹ tvrdeći kako je vezanje tRNA^{Ser} pozitivno kooperativno. Vjerojatni primjer negativno kooperativnog vezanja vidljiv

je kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae*³⁵ gdje je dokumentirano nastajanje kompleksa SerRS:(tRNA^{Ser})₂ u kojemu su molekule tRNA vezane vrlo nejednolikim afinitetima.

2.2.1. Seril-tRNA-sintetaze metanogenog tipa

Sve do sada opisivane SerRS sintetaze pripadaju tzv. bakterijskom tipu koji je prisutan u svim eukariotima, bakterijama i glavnini arheja, dok metanogene arheje (osim *Methanosarcina mazei* i *Methanosarcina acetivorans*) posjeduju tzv. metanogeni tip SerRS.^{36,37} Ovakav drugačiji tip SerRS prvi put je otkriven sekvenciranjem gena metanogene arheje *Methanococcus jannaschii*³⁸, dok je kasnije dokumentiran i u drugim metanogenim arhejama. Metanogeni tip SerRS također formira homodimere, no značajno divergira u odnosu na uobičajeni bakterijski tip na razini homologije aminokiselinskog slijeda³⁹, u načinu prepoznavanja molekula tRNA^{Ser},⁴⁰ te u mehanizmu serilacije što je prvotno naslućeno u pokusima inhibicije aminoacilacijske aktivnosti serin-amidom⁴¹ (koji je uspješno blokirao aktivnost metanogenog tipa SerRS, ali nije utjecao na aktivnost bakterijskog tipa), a konačno objašnjeno rješavanjem kristalne strukture metanogenog tipa SerRS iz metanogene arheje *Methanosarcina barkeri*⁴². Ova arheja zanimljiva je i stoga što je u njoj dokazana koegzistencija metanogenog i bakterijskog tipa SerRS.⁴⁰ Bilokapić i suradnici⁴² riješili su 2006. godine kristalne strukture homodimera metanogenog tipa SerRS iz arheje *M. barkeri* (Mb-SerRS) samostalno i u kompleksima s ATP-om, serinom ili inhibitorom 5'-O-[N-(L-seril)-sulfamoi]adenozinom (SerRS-AMS). Uspoređujući strukturu Mb-SerRS s otprije riješenim kristalnim strukturama SerRS bakterijskog tipa iz vrsta *E. coli*¹¹, *T. thermophilus*⁴³ i *Bos taurus* (mitohondrijska)⁴⁴ zapazili su značajno veću N-terminalnu domenu u metanogenom tipu SerRS (slika 2b) građenu od šesterostrane antiparalelne β-ploče okružene s tri α-uzvojnice (H1, H2 i H4), te dodatnom H3 α-uzvojnicom okomitom na ravninu prethodnih uzvojnica. C-terminalna katalitička domena strukturirana je osmerostranom β-pločom okruženom α-uzvojnica, dok aktivno mjesto sadrži ion cinka tetraedarski koordiniran bočnim lancima Cys306, Glu355, Cys461 i molekulom vode što nikako nije slučaj u aktivnom mjestu SerRS bakterijskog tipa. Molekula vode u koordinaciji metalnog iona upućuje na njegovu katalitičku ulogu, prije nego strukturnu, pri čemu se u katalizi ona otpušta kako bi oslobodila vezno mjesto za supstrat.⁴² Nadalje, osim skraćenog motiva 2, Mb-SerRS (kao i ostale SerRS metanogenog tipa) posjeduje specifične sekvencijske insercije

duljine oko 30 aminokiselina između motiva 1 i 2 što rezultira karakterističnim strukturnim motivom HTH (eng. *helix-turn-helix*), odnosno između motiva 2 i 3 (pozicije u sekvenci 394-410) izgradnjom fleksibilnog motiva tzv. serinske omče (eng. *serine ordering loop*) (slika 3.). Motivi HTH susjednih podjedinica homodimerne strukture se isprepliću na način da motiv HTH jedne podjedinice naliježe na N-terminalnu i katalitičku domenu druge podjedinice stabilizirajući homodimernu strukturu preko ionskih veza s H4 uzvojnicom N-terminalne domene. Dodatna predložena uloga ovog motiva je sudjelovanje u pravilnom pozicioniranju molekule tRNA na SerRS. Serinska omča sudjeluje u oblikovanju veznog džepa aktivnog mjesta, a time i stabilizaciji vezanog serina, odnosno održavanja optimalne aminokiselinske selektivnosti.



Slika 3. Kristalna struktura katalitičke domene SerRS metanogenog tipa iz arheje *M. barkeri* s ionom cinka. Strukturni motivi 1, 2 i 3 označeni su redom bojama: žuto, plavo i zeleno (preuzeto i prilagođeno prema⁴²).

Dok je aktivno mjesto prazno, ovaj motiv strukturno je potpuno neuređen, no vezanjem serina dolazi do značajnih konformacijskih promjena koje ga dovode u neposrednu blizinu cinkovog iona što omogućuje kontakt Gln400 i karbonilnog kisika serinskog supstrata (s obzirom da pozicija Gln400 nije konzervirana, vjerojatno u drugim SerRS metanogenog tipa ovakvu ulogu ima Arg). Vezanje nepripadne aminokiseline u aktivno mjesto sterički je nepovoljno, budući da onemogućuje postizanje aktivne konformacije serinske omče. Prema modelu vezanja koje su razvili Bilokapić i suradnici (2006) središnju ulogu u određivanju veličine veznog džepa ima Trp396 koji naliježe iznad serinske amino skupine u aktivnom mjestu. Iako ova pozicija nije u potpunosti konzervirana kod metanogenog tipa SerRS, dokazano je da zamjena Trp s Phe u nekim metanogenim arhejama narušava povoljnu konformaciju vezanja u aktivno mjesto. Za uspješno vezanje potrebno je zadovoljiti uvjet veličine veznog džepa, odnosno prisutnosti slobodne β -hidroksilne skupine aminokiseline. Vezanje ATP-a slijedi

obrazac vezanja karakterističan za aaRS razreda II: molekula ATP-a je umetnuta između aromatskog prstena Phe351 (motiv 2) i gvanidinske skupine Arg468 (motiv 3), te stabilizirana interakcijama s atomom kisika glavnog lanca Val348 (motiv 2), odnosno karboksilnom skupinom bočnog ogranka Glu338 (motiv 2). 3'-hidroksilna skupina riboze uspostavlja vodikovu vezu s Glu432, dok se 2'-hidroksilna skupina na isti način povezuje s karbonilnim kisikom Phe433. Fosfati zajedno s bočnim lancima aminokiselinskih ostataka koordiniraju magnezijeve ione na način da α - i β - fosfati zajedno s bočnim lancima Asp416, Glu432, Asn435 koordiniraju jedan Mg^{2+} , dok β - i γ - fosfati zajedno s bočnim lancima Glu338 i Arg336 drugi Mg^{2+} . Dodatna stabilizacija fosfata događa se zahvaljujući dodatnim vodikovim vezama γ -fosfata s amino skupinama Arg468 i Arg347, odnosno α -fosfata s Arg336. Nadalje, vezanje serina kod metanogenog tipa značajno je drugačije u odnosu na bakterijski tip. Serin se u aktivnom mjestu metanogenog tipa veže na ion cinka tetraedarski koordiniran sa Cys306, Glu355, Cys461 i molekulom vode koja tom prilikom ustupa mjesto serinskoj amino skupini. Presudna važnost ovih aminokiselina za efikasnu aminoacilaciju dokazana je uvođenjem ciljanih točkastih mutacija što je rezultiralo potpunim gubitkom enzimske aktivnosti. Dodatna stabilizacija serinske amino skupine uspostavlja se vodikovom vezom s kisikom glavnog lanca Ala304. Hidroksilna skupina bočnog ogranka serina uspostavlja vodikove veze s Arg353 i Glu355 koji istu stabilizacijsku funkciju serina u aktivnom mjestu pokazuje i u bakterijskom tipu SerRS.

Prema računalnim modelima,⁴² vezanje molekule $tRNA^{Ser}$ na homodimer SerRS metanogenog tipa odvija se kao i u bakterijskom tipu SerRS uzduž obje podjedinice homodimera. Dugačka varijabilna omča $tRNA^{Ser}$ negativno nabijene okosnice interagira s pozitivno nabijenim površinama uzvojnica H1 i H2 N-terminalne domene enzima.

2.3. Proteinske interakcije aaRS

Proteini svoje djelovanje u stanici ostvaruju samostalno ili u interakciji s drugim makromolekulama, no također nije rijetkost da proteini u kompleksima pokazuju potpuno drugačiju funkcijsku narav u odnosu na samostalno djelovanje. Proteinske interakcije aaRS događaju se radi ostvarivanja i optimizacije translacijskih funkcija ili radi ispoljavanja drugačijih nekanonskih funkcija koje nisu povezane s biosintezom proteina. Tako primjerice u

arheji *Methanothermobacter thermautotrophicus* LeuRS veže LysRS i ProRS u stabilni ternarni kompleks LysRS_N:LeuRS_C:ProRS ($K_d = 0,3-0,9 \mu\text{mol dm}^{-3}$) radi pojačavanja aminoacilacijske aktivnosti LysRS i ProRS.⁴⁵ Utjecaj svake pojedine aaRS na katalitičke karakteristike ostalih aaRS u kompleksu istražen je u kinetičkim pokusima nakon uspostavljanja ustaljenog stanja dodavanjem, odnosno oduzimanjem komponenti kompleksa. Još ranije je pokazano⁴⁶ kako nastajanje kompleksa LeuRS:ProRS značajno pojačava aminoacilaciju tRNA^{Pro} povećavajući katalitičku efikasnost (k_{cat} / K_M) 5 puta, dok su nova kinetička istraživanja pokazala kako LeuRS i ProRS dodani odvojeno ili zajedno u smjesu s LysRS utječu na aminoacilaciju tRNA^{Lys}. Nastajanjem kompleksa LysRS i LeuRS, K_M za tRNA^{Lys} smanjila se 3 puta, dok je utjecaj ProRS na aktivnost LysRS bio manji, ali ipak uočljiv (smanjenje K_M za tRNA^{Lys} oko 30 %). Formiranjem ternarnog kompleksa nije došlo do dodatnog smanjenja vrijednosti K_M za tRNA^{Lys} od već opisanog u binarnim kompleksima, a također nije zabilježen niti kinetički utjecaj LysRS na katalitičko djelovanje LeuRS i ProRS. U istoj arheji dokumentiran je i kompleks LeuRS⁴⁷ s elongacijskim faktorom EF-1 α koji se veže na tRNA i usmjerava je prema ribosomu. Kinetički eksperimenti pokazali su da u prisutnosti EF-1 α dolazi do trostrukog povećanja aminoacilacijske aktivnosti LeuRS, odnosno osmerostrukog povećanja obrtnog broja za sintezu Leu-tRNA^{Leu}. Hausmann i suradnici (2007) predložili su postojanje kvaternog kompleksa sastavljenog od tri aaRS (LeuRS, LysRS i ProRS) u kojemu bi EF-1 α bio vezan preko LeuRS i djelovao na povećanje aminoacilacijske efikasnosti aaRS u kompleksu, odnosno sudjelovao u recikliranju tRNA otpuštenih s ribosoma. Konačno, u istom arhejskom sustavu Godinić-Mikulčić i suradnici^{48,49} otkrili su stabilni kompleks ($K_d = 250 \text{ nmol dm}^{-3}$) ArgRS sa SerRS metanogenog tipa. U kinetičkim eksperimentima dodatkom ArgRS u smjesu SerRS i tRNA^{Ser} dokumentiran je četverostruki porast aminoacilacijske aktivnosti SerRS, dok u obrnutom slučaju (dodavanja SerRS) nije zabilježen utjecaj na aminoacilacijsku aktivnost ArgRS. Zanimljivo, najveće povećanje efikasnosti aminoacilacije detektirano je u uvjetima povišene temperature i osmolarnosti, što se tumači kao vid optimizacije aminoacilacije u ekstremnim uvjetima u kojima arheja živi. Nadalje, biofizičkim metodama lokalizirano je vezanje ovog kompleksa na veliku podjedinicu ribosoma u regiji drške L7/L12 što pogoduje brzom recikliranju molekula tRNA i povećanju translacijske efikasnosti.

Utjecaj nesintetaznih proteinskih elemenata u kompleksima s aaRS na efikasnost aminoacilacije vidljiv je, osim kod spomenutog EF-1 α , i drugdje. U kvascu *S. cerevisiae* aminoacil-tRNA-sintetazni kofaktor 1 (Arc1p) uspostavlja svojom N-terminalnom domenom interakcije s GluRS i MetRS, dok na C-kraju sadrži tRNA-veznu regiju.⁵⁰⁻⁵³ U kinetičkim eksperimentima MetRS je u smjesi s Arc1p pokazao 5 puta veću vrijednost obrtnog broja u odnosu na reakciju u kojoj nije bilo kofaktora. Simos i suradnici (1996)⁵⁰ objašnjavaju utjecaj Arc1p na aminoacilaciju MetRS efikasnijim dovođenjem tRNA^{Met} u neposrednu blizinu MetRS. Naime, nakon sinteze nove tRNA^{Met} u jezgri stanice ili otpuštanjem s ribosoma, Arc1p je spreman vezati slobodnu tRNA i na taj način je dovesti relativno brzo u neposrednu blizinu MetRS s kojom ostvaruje kompleks. Arc1p također značajno povećava vezanje tRNA^{Glu} na GluRS smanjujući vrijednost konstante disocijacije kompleksa GluRS:tRNA^{Glu} skoro 120 puta.⁵³ Slično aminoacilacijsko stimulirajuće djelovanje pokazuje još jedan kvašćev protein, Pex21p. Ovaj protein inače uključen u biosintezu peroksisoma, interagira s pozitivno nabijenim produžetkom na C-kraju SerRS vjerojatno izazivajući konformacijske promjene koje pogoduju vezanju pripadne tRNA uz blago povećanje aminoacilacijske aktivnosti SerRS.⁵⁴⁻⁵⁶

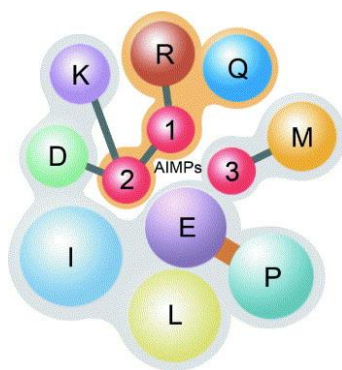
Osim za povećanje aminoacilacijske efikasnosti, aaRS mogu ulaziti u proteinske komplekse i s ciljem povećanja aminoacilacijske specifičnosti. Vezanje odgovarajuće aminokiseline na pripadnu molekulu tRNA esencijalno je za ispravnu biosintezu proteina. AaRS kao središnji enzimi u pripremi translacije razvili su različite strukturne i mehanističke prilagodbe kako bi specifičnost prepoznavanja i prijenosa odgovarajuće aminokiseline ostala visoko očuvana. Popravlak pogrešaka u aminoacilaciji aaRS ostvaruju pomoću korektivnih domena dodanih njihovoj katalitičkoj srži ili uspostavom interakcija s drugim samostojećim korektivnim proteinima. Primjer takve interakcije vidljiv je u slučaju proteina ProRS i YbaK iz bakterije *Haemophilus influenzae*. Za ProRS iz sve tri domene života dokumentirana je sposobnost misacilacije tRNA^{Pro} cisteinom. Kako ProRS nije u mogućnosti samostalno ispraviti pogrešku, do hidrolize pogrešno sparene aminokiseline dolazi usred interakcije s YbaK. Ovaj protein je homolog korektivne domene ProRS koja služi popravljaju pogreške u slučaju pogrešno vezanog alanina na tRNA^{Pro}.⁵⁷⁻⁵⁹ YbaK u kompleksu s ProRS deacilira Cys-tRNA^{Pro}, ali također ometa novu misacilaciju tRNA^{Pro}. Kompeticijski kinetički eksperimenti s YbaK i elongacijskim faktorom EF-Tu pokazali su kako YbaK ne može kompetirati s EF-Tu za Cys-

tRNA^{Pro} što navodi na zaključak da se korektivno djelovanje YbaK događa dok je u kompleksu s ProRS, odnosno dok je Cys-tRNA^{Pro} još uvijek vezana na ProRS.⁵⁸

Postavka kako za svaku proteogenu aminokiselinu u svakom organizmu postoji specifična aaRS, nije primjenjiva u svijetu prokariota. Većina bakterija, kao i sve do sada poznate arheje ne posjeduju gene za GlnRS, glavnini prokariota nedostaje AsnRS, dok većina metanogenih arheja u svome aaRS repertoaru nema CysRS. Također, niti u jednoj domeni života do danas nije dokumentirano postojanje SecRS.⁶⁰ Međutim, efikasna biosinteza proteina u ovim organizmima nije ugrožena stoga što ulogu deficitarnih aaRS kompenziraju druge stanične aaRS relaksirane specifičnosti sparujući aminokiseline na nepripadne tRNA molekule. Molekula Asn-tRNA^{Asn} u prokariotima nastaje misacilacijom tRNA^{Asn} aspartatom od strane nediskriminirajuće AspRS što dovodi do nastajanja Asp-tRNA^{Asn}. U daljnjem koraku aspartat se djelovanjem amidotransferaze GatCAB prevodi u asparagin i tako nastaje Asn-tRNA^{Asn}.⁶¹⁻⁶⁴ Kao što je utvrđeno u bakteriji *T. thermophilus*, dovodenje misaciliranog intermedijarnog kompleksa Asp-tRNA^{Asn} na ribosom i ugradnja pogrešne aminokiseline u nastajući polipeptid nije moguća stoga što bakterijski elongacijski faktor EF-Tu (koji usmjerava aminoaciliranu tRNA na ribosom) ne pokazuje afinitet za vezanje na Asp-tRNA^{Asn}, već samo Asn-tRNA^{Asn}.⁶¹ Konačno, na primjeru iste bakterije kasnije je pokazano u eksperimentima *in vivo* i *in vitro* postojanje ternarnog kompleksa između AspRS, tRNA^{Asn} i GatCAB nazvanog transamidosom čija funkcija je zadržavanje misaciliranog intermedijera sve dok Asp nije preveden u Asn.⁶⁵ Analogni biokemijski put koji uključuje GatCAB transamidazu nađen je i kod misaciliranja tRNA^{Gln} nediskriminirajućom prokariotskom GluRS.⁶⁶⁻⁶⁸ Iako u pokusima *in vitro* nije dokumentiran, vjeruje se da i ovdje dolazi do formiranja transamidosoma.⁶⁹

Osim već spomenutih multi-aaRS kompleksa u kvascu i arheji *M. thermautotrophicus*, udruživanje više sintetaza dokumentirano je i u arheji *Haloarcula marismortui* gdje većina, ako ne i sve aaRS, sudjeluju u formiranju jednog ili eventualno dva velika kompleksa.⁷⁰ Kod arheje *Methanocaldococcus jannaschii* ProRS interagira s dehidrogenazom Mj1338 uključenom u biokemijski put sinteze metana.⁷¹ Ovaj protein također ostvaruje interakciju i s LysRS, odnosno AspRS što otvara teoretsku mogućnost uspostavljanja većeg zajedničkog kompleksa između ProRS, LysRS, AspRS i Mj1338 kao medijatora, koji još uvijek nije dokumentiran. U arheji *Thermococcus kodakarensis* metodom afinitetnog supročišćavanja

(gdje je kao protein mamac upotrijebljen LeuRS) s LeuRS supročišćeno je još 5 drugih aaRS (LeuRS, ProRS, TyrRS, GlyRS, MetRS, CysRS) zajedno s drugim proteinima (mahom 30S ribosomskih proteina, te zanimljivo, inicijacijskih i elongacijskih translacijskih faktora).⁷⁵ I dok u bakterijama i biljkama do danas još nisu pronađeni multi-aaRS kompleksi, u stanicama sisavaca dokazan je kompleks sastavljen od devet aaRS (LeuRS, IleRS, LysRS, ProRS, MetRS, GlnRS, GluRS, ArgRS, AspRS) i tri nesintetazna proteina: p18, p38 i p43 koji sudjeluju u vezanju tRNA, stabilizaciji kompleksa i nekanonskom djelovanju (slika 4.).⁷²⁻⁷⁴ Funkcionalna pozadina udruživanja aaRS u multisintetazne komplekse nije u potpunosti razjašnjena, no smatra se kako takvo okupljanje aaRS zajedno s ostalim komponentama translacijskog aparata dovodi do tzv. translacijskog usmjeravanja i brže regeneracije upotrijebljenih tRNA molekula, odnosno povećanja efikasnosti translacije. Nadalje, multi-aaRS kompleksi mogli bi služiti kao svojevrsan repozitorij aaRS iz kojeg bi se one otpuštale



Slika 4. Multiaminoacil-tRNA-sintetazni kompleks u stanicama sisavaca kojeg čini 9 aaRS (označene jednoslovnim kraticama) i tri AIMP (eng. *aaRS interacting multifunctional protein*) proteina: AIMP1 (p43), AIMP2 (p38) i AIMP3 (p18), (preuzeto iz¹).

u slučajevima kada je stanici potrebno njihovo nekanonsko djelovanje.¹ U korist ovakvoj teoriji ide i ponašanje neobične fuzijske sintetaze GluProRS sastavljene od katalitičkih domena GluRS i ProRS koja je dio multi-aaRS kompleksa u sisavca. Tijekom upalnog procesa interferon IFN- γ potiče fosforilaciju GluProRS što dovodi do njenog otpuštanja iz multi-aaRS kompleksa i vezanje u novi heterotetramerni tzv. GAIT kompleks zajedno s proteinom NSAP1, ribosomskim proteinom L91 i GAPDH, koji se potom može vezati na mRNA ceruloplazmina (protein uključen u upalni odgovor) što dovodi do njegovog translacijskog utišavanja i modulacije upalnog procesa.¹⁶ LysRS je još jedna sintetaza multi-aaRS kompleksa koja također pokazuje raznovrsna nekanonska djelovanja: sintetizirajući

alarmone (primitivne glasničke molekule koje nastaju u okolnostima kada aaRS aminoacil-adenilat ne prenose na tRNA, već ga s pirofosfatom vežu u oligofosfatni spoj Ap_nA), djelujući kao citokin u modulaciji upalnog odgovora, medijator stanične smrti, odnosno sudjelujući u sklapanju virusnih čestica HIV-1.⁷⁶

Drugačija vrsta velikog makromolekularnog kompleksa u stanicama sisavaca u kojemu za razliku od aaRS kompleksa sudjeluje samo jedna aaRS uspostavljajući istovremeno niz interakcija s drugim nesintetaznim elementima dokumentirana je u slučaju kompleksa ValRS i "teže" varijante elongacijskog faktora EF-1, tzv. EF-1H koju čine podjedinice EF-1 α , EF-1 β , EF-1 γ i EF-1 δ .⁷⁷

2.4. Lokalizacija aminoacil-tRNA-sintetaza u stanicama

Katalička uloga aaRS u translaciji podrazumijeva njihovu lokalizaciju u kloroplastima, mitohondrijima i citosolu. Citosolne i organelne varijante aaRS kodiraju geni smješteni u jezgri, biosinteza se odvija na ribosomima u citoplazmi, a unos u organele moguć je zahvaljujući signalnim sljedovima na N-kraju proteina. Biljni proteini mogu posjedovati signalne sekvence koje ih upućuju ili samo u kloroplaste ili samo u mitohondrije, odnosno one koje im omogućuju dualnu lokalizaciju u kloroplastima i mitohondrijima. Sekvenciranjem čitavog genoma biljnog organizma *A. thaliana* pronađeno je 45 gena smještenih u jezgri koji kodiraju za aaRS, dok niti jedan gen za aaRS nije pronađen u genomu kloroplasta i mitohondrija. Za većinu aaRS postoje 2 gena (GluRS, HisRS, IleRS, LysRS, MetRS, ProRS, SerRS, TrpRS, GlyRS, ValRS, AlaRS, LeuRS, ArgRS), neke aaRS su kodirane s 3 gena (PheRS, AsnRS, CysRS, AspRS, TyrRS, ThrRS), dok je dokumentiran samo jedan slučaj gdje jedan gen kodira jednu vrstu aaRS (GlnRS). Od ukupno 45 proteina, 21 je isključivo lokaliziran u citosolu. Dva (od čega 1 samo potencijalno) pokazuju isključivo kloroplastnu lokalizaciju, dok nije dokumentirana isključivo mitohondrijska lokalizacija. Čak 17 aaRS pokazuje dualnu lokalizaciju, od čega je 13 lokalizirano u mitohondrijima i kloroplastima, 4 su lokalizirana u citosolu i mitohondrijima, a 1 je nađen i u organelima i citoplazmi.⁷⁸

Tablica 2. Broj gena koji kodiraju za različite aaRS, te broj različitih varijanti iste vrste aaRS, kao i njihova lokalizacija u stanici biljke *A. thaliana* (preuzeto i prilagođeno iz⁷⁸).

Broj gena koji kodiraju za različite vrste aaRS	AaRS	Broj različitih varijanti iste vrste aaRS i njihova lokalizacija u stanici
2	GluRS, HisRS, IleRS, LysRS, MetRS, ProRS, SerRS, TrpRS GlyRS, ValRS AlaRS LeuRS ArgRS	1 C, 1 M-K 1 C-M, 1 M-K 1 C-M-K, 1 M-K 1 C-M, 1 K 1-C(?), 1 C-M-K(?)
3	PheRS AsnRS, CysRS, AspRS, TyrRS ThrRS	1 heterotetramerni ($\alpha 2\beta 2$) C, 1 M-K 2 C (paralozi), 1 M-K 1 C, 1 C-M, 1 M-K
1	GlnRS	1 C, 1 M-K GatCAB amidotransferaza

Lokalizacija - C: citoplazma, M: mitohondriji, K: kloroplasti

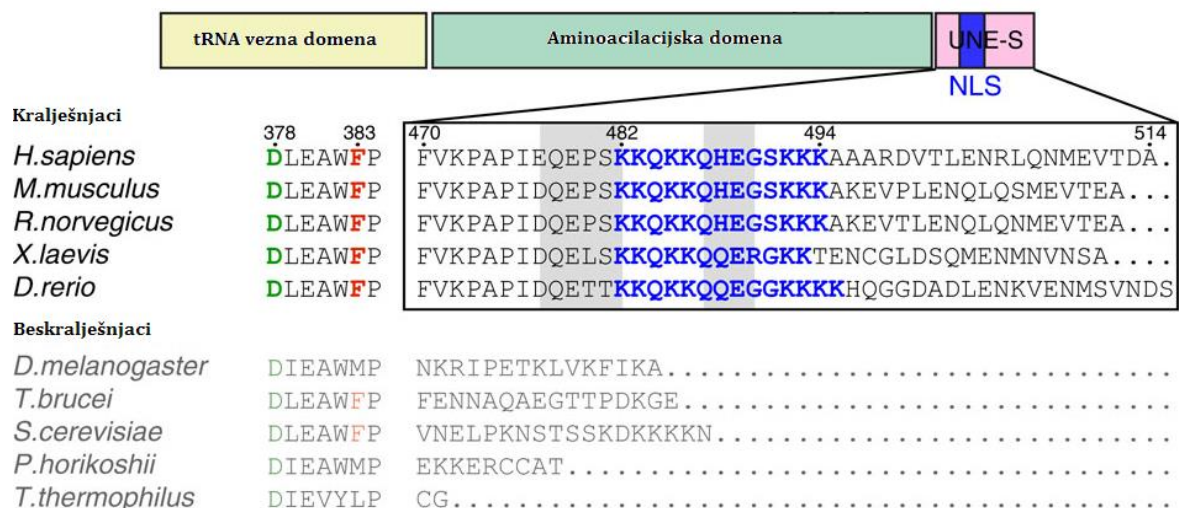
Interakcija aaRS i molekule DNA uočena je već kod AlaRS iz bakterije *E. coli*⁷⁹ koja se tamo veže na palindromske sljedove u neposrednoj blizini početnog mjesta transkripcije vlastitog gena reprimirajući tako njegovu ekspresiju. Alanin potiče jače vezanje AlaRS na DNA čime je i učinak represije veći. U eukariotskih organizama s jezgrom dokumentirano je kako različiti proliferativni signali (inzulin, EGF (eng. *epidermal growth factor*), PDGF (eng. *platelet-derived growth factor*)) dovode do lokalizacije humane MetRS u jezgri, gdje u jezgri MetRS stimulira biogenezu rRNA⁸⁰ kao dio priprema za predstojeću staničnu diobu. Već ranije spomenuti nesintetazni protein Arc1 iz kvašćevog kompleksa GluRS:Arc1:MetRS osim uloge u pojačavanju aminoacilacije, također sudjeluje i u regulaciji stanične lokalizacije GluRS i MetRS. Kada je uspostavljen ternarni kompleks, obje aaRS su lokalizirane samo u citoplazmi; s druge strane, inhibicijom uspostave kompleksa zamijećene su značajne količine GluRS i MetRS u jezgri.⁸¹ Još jedna pretpostavljena uloga aaRS u jezgri je kontrola funkcionalne ispravnosti novosintetiziranih molekula tRNA. Ove molekule prije prolaska kroz jezgrinu ovojnici i otpuštanja u citoplazmu prolaze niz modifikacija koje uključuju uklanjanje suvišnih sekvenci na 5'- i 3'-krajevima, izrezivanje introna, modifikaciju nukleotida i dodavanje slijeda CCA na 3'-kraj. Ukoliko je proces "sazrijevanja" tRNA molekula uspješno završen, aaRS bi trebale moći vezati odgovarajuću aminokiselinu na pripadnu tRNA molekulu i na taj način provesti provjeru funkcionalnosti dok je molekula tRNA još uvijek unutar jezgre u dohvat modifikirajućih enzima. U istraživanjima na oocitima iz *Xenopus leavis* korištenjem radioaktivno obilježenih molekula tRNA dokazana je specifična nuklearna aminoacilacija sedam različitih vrsta tRNA (za Ala, Asp, Leu, Lys, Met i Tyr).⁸² Nadalje, pokazano je kako inhibicija aminoacilacije u slučaju tRNA^{Tyr} i tRNA^{Asn} (korištenjem tirozin

sulfamoi adenoza (Tyr-AMS), odnosno Asn-AMS, snažnih inhibicijskih kompetitora Tyr-AMP i Asn-AMP intermedijera) značajno smanjuje prijenos tRNA^{Tyr} i tRNA^{Asn} iz jezgre u citoplazmu, iako ga ne zaustavlja u potpunosti. Mogućnost nuklearnog "nakupljanja" aaRS primjećena je i u kvascu *S. cerevisiae* na primjeru TyrRS.^{83,84} Jezgri TyrRS (Tys1p) sadrži nuklearnu lokalizacijsku sekvencu (NLS) koja mu omogućuje ulazak u jezgu. Uvođenjem mutacija u ovu regiju katalitička efikasnost enzima nije bitno narušena, ali dolazi do smanjivanja Tys1p proteina u jezgri, te do značajnog pada transporta tRNA^{Tyr} iz jezgre u citoplazmu. Zanimljivo je ipak što i ovdje kao i u prethodnom primjeru dolazi do izlaska neaminoaciliranih tRNA iz jezgre i to nikako ne umanjuje vijabilnost stanica.

NLS pronađen je također i u SerRS kralješnjaka (od riba do ljudi), gdje dokazano sudjeluje u unosu ovih enzima u jezgu. C-kraj kralješnjačkih SerRS sadrži specifičnu nekatalitičku dodatnu UNE-S domenu u čijoj se sekvenci može identificirati visoko konzervirani bipartitni NLS sastavljen od dva niza lizina odvojenih drugim aminokiselinama (slika 5.). Važnost NLS, odnosno pojedinih lizina za ulazak u jezgu dokazana je mutacijskim analizama humane SerRS. U slučajevima kada je mutacijama izazvano djelomično (Δ 482-514) ili potpuno (Δ 470-514) uklanjanje NLS-a, lokalizacija SerRS u jezgri humanih stanica HEK 293T (eng. *human embryonic kidney cells*) nije detektirana. Također, zamjena lizina u bipartitnom signalu alaninima značajno je smanjila unos SerRS u jezgu na način da se efekt povećavao kako se povećavao broj zamijenjenih lizina (zamjena K493A dovela je do blagog smanjenja nuklearne distribucije SerRS, dok je zamjena K482A/K485A/K493A značajno utjecala na smanjenje).⁸⁵ Prema *western-hibridizacijskim* analizama udio ukupne stanične humane SerRS u jezgri iznosi oko 10 %, gdje sudjeluje u regulaciji ekspresije gena *vegfa* što je opisano ranije.

TyrRS je još jedna humana aaRS sa sposobnošću ulaska u jezgu stanice. Njezin NLS ujedno je i tRNA-vezno mjesto (242 KKKLKK 247),¹³⁵ te je ulazak u jezgu moguć samo kada na nju nije vezana molekula tRNA. U jezgri sudjeluje u aktivaciji transkripcijskog faktora E2F1 čime se pojačava ekspresija gena poput BRCA1 i RAD51 koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u zaštiti molekule DNA od oštećenja. U pokusima na organizmu *Danio rerio* uočeno je kako ulazak TyrRS u jezgu štiti od dvostrukih lomova DNA izazvanih UV

zračenjem, budući da se nakon blokiranja transporta TyrRS u jezgu, broj dvostrukih lomova DNA značajno povećao.¹³³



Slika 5. Prikaz aminokiselinskog slijeda jedinstvene dodatne UNE-S domene na C-kraju SerRS kod različitih vrsta kralješnjaka. Plavom bojom su označeni visoko očuvani sljedovi koji odgovaraju nuklearnom lokalizacijskom signalu koji omogućuje ulazak SerRS iz stanica sisavaca u jezgu (preuzeto i prilagođeno iz ⁵).

2.5. Abiotički stres i biljne aminoacil-tRNA-sintetaze

Utjecaj okoline na biljni organizam očituje se kroz interakciju biljaka s drugim organizmima (biotički utjecaj), odnosno kroz djelovanje raznovrsnih abiotičkih čimbenika. Nepovoljan utjecaj temperature, hidracije, saliniteta, nedovoljna aeracija, povećana koncentracija teških metala u tlu, nepovoljno osvjetljenje, radioaktivnost, djelovanje herbicida, mehaničko ozljeđivanje i drugi neživi utjecaji dovode biljni organizam u stanje abiotičkog stresa. Biljke stres mogu ili izbjegavati preživljavanjem u fiziološki neaktivnom stanju u obliku sjemena ili se reverzibilno prilagođavati novonastalim uvjetima. Prilagođavanje na stresne uvjete okoline podrazumijeva promjene u transkriptomu, proteomu i metabolomu stanice, te se odvija u nekoliko faza: u inicijalnoj fazi uslijed pojave stresnih utjecaja razina tolerancije na stres biljnog organizma opada, dolazi do akutnog oštećenja biljnog tkiva, da bi u idućoj aklimatizacijskoj fazi nakon pokretanja obrambenih mehanizama, tolerancija ponovno rasla do uspostave nove homeostaze. Slijedi faza u kojoj biljka nastoji održavati utjecaje stresora

što manjima, održavajući toleranciju na stres stalnom. Ukoliko je utjecaj stresora dugotrajan dolazi do iscrpljivanja fizioloških resursa biljnog organizma uz smanjivanje tolerancije na stres što za biljni organizam može biti fatalno. Prestankom djelovanja stresnog podražaja ovisno o opsegu nastalog oštećenja dolazi do faze oporavka. Za svaku od navedenih faza primijećen je drugačiji sastav proteoma: u inicijalnoj fazi dolazi do pojačane sinteze proteina uključenih u signalne puteve aktivirane stresom, odnosno uključene u oksidacijski stres. U aklimatizacijskoj fazi *de novo* se biosintetiziraju proteini uključeni u zaštitu od stresa (kao i drugi spojevi poput antioksidansa, osmoprotektanata i dr.). Fazu oporavka karakterizira razgradnja prethodno proizvedenih zaštitnih spojeva.⁸⁶

AaRS mogu biti uključene u odgovor organizma na stres posredno sintezom primitivnih glasnika tzv. Alarmona,⁸⁷ dinukleozid 5',5'',- P^I, P^n -oligofosfatnih spojeva, $Np_n N'$ (gdje N i N' predstavljaju 5'-O-nukleozide, a n označava broj fosfatnih skupina u oligofosfatnom lancu koji povezuje dva nukleozidna ostatka) ili direktno (spomenuto ranije na primjeru animalnih aaRS). Alarmoni sintetiziraju određene transferaze i ligaze (među kojima i neke aaRS), također i luciferaza, a dokumentirani su u bakterijama, kvascu i životinjama.⁸⁸ U skupini biljnih aaRS do sada je utvrđena sposobnost sinteze diadenozinskih tetrafosfatnih spojeva (Ap_4A) jedino za SerRS i PheRS iz *Lupinus luteus*.⁸⁹ Obje sintetaze su u pokusima *in vitro* proizvodile spoj Ap_4A uslijed deficita pripadnih tRNA molekula, dok je za uspješnu sintezu Ap_4A PheRS nužno trebala i cink za koji je poznato da ima sposobnost inhibirati kanonsku aminoacilaciju tRNA^{Phe}. Međutim, o samom mehanizmu djelovanja alarmona u biljkama ne zna se mnogo. Pietrowska-Borek i suradnici⁸⁸ istraživali su signalno "alarmirajuće" djelovanje egzogenih Ap_3A i Ap_4A u biljci *A. thaliana*, spojeva koji se u višim biljkama vjerojatno nakupljaju uslijed stresa izazvanog teškim metalima. Kako teški metali u biljkama stimuliraju sintezu različitih flavonoida i lignina za koje se smatra da imaju antistresno djelovanje,⁹⁰ ova skupina autora željela je istražiti hoće li se dodavanjem egzogenih Ap_3A i Ap_4A promijeniti aktivnost fenilpropanoidnog metaboličkog puta u kojemu dolazi do sinteze flavonoida i lignina. Nasađivanjem sedmodnevnih klijanaca *A. thaliana* na hranjivu podlogu u koju su bili dodani egzogeni Ap_3A i Ap_4A u mikromolarnim koncentracijama došlo je do pojačane genske ekspresije i enzimske aktivnosti za fenilalanin-amonij-lijazu (FAL) i 4-kumarat-koenzim A-ligazu (4CL), enzima spomenutog metaboličkog puta što je jasno ukazalo na signalnu ulogu Ap_nA spojeva u stresu. Nadalje, kako je pokazano na primjeru SerRS iz *A. thaliana*⁹ i

proteinu sličnom LysRS iz rajčice⁸, teški metali mogu utjecati na promjenu koncentracije aaRS u biljnom organizmu. U prvom primjeru, Sarry i suradnici (2006) izlagali su suspenzije stanica *A. thaliana* kroz 24 sata različitim koncentracijama CdCl₂ (od 0 - 200 µmol dm⁻³) na dva različita hranjiva medija (Murashige i Skoog (MS), te Gamborg B5 (GB5)). Kombinacijom 2D-poliakriamidne elektroforeze i spektrometrije masa iz uzorka ukupnih proteina stanice izdvojili su i identificirali one kojima se koncentracija u stanici značajno promijenila u prisutnosti kadmija. Dodatnim *northern-hibridizacijskim* i RT-PCR analizama za pojedine proteine utvrđene su i promjene na razini transkripcije. Reakcija stanica na stres izazvan kadmijem očitovala se u povećanju koncentracije širokog raspona enzima uključenih u bazični energetskei metabolizam, proteolizu, antioksidacijsku zaštitu, konačno i biosintezu proteina. Jedina aaRS za koju je dokumentirano povećanje koncentracije (1,9 puta u odnosu na kontrolu) na obje hranjive podloge (MS i GB5) bila je SerRS. U drugom slučaju Giritch i suradnici (1997) istraživali su promjene genske ekspresije ovisne o promjeni koncentracije željeza u mutantu rajčice (*Lycopersicon esculentum*, *chloronerva*). S obzirom da ovaj mutant nema funkcionalnu regulaciju homeostaze željeza mehanizmi kompenzacije su neprestano aktivirani što dovodi do prekomjernog nakupljanja ne samo željeza, već i ostalih teških metala (bakra, cinka, mangana) u različitim biljnim organima, a posljedično tome i specifičnog fenotipa karakteriziranog usporenim rastom, pojavom kloroze mladih listova (promjena koloracije lisne mase), te morfološkim promjenama korijena (ekstenzivno grananje, bubrenje vrškova). Analizom cDNA uzoraka dobivenih iz mutiranih biljaka i biljaka divljeg tipa uočena je diferencijalna nadekspresija gena u stanicama korijena mutanta u odnosu na divlji tip koji kodira za protein visoke sekvencijske sličnosti prokariotskoj i eukariotskoj LysRS. Otprije je poznato kako nakupljanje metalnih iona u korijenu biljaka s nefunkcionalnom regulacijom homeostaze željeza dovodi do nastajanja slobodnih radikala,⁹¹ te je razumna pretpostavka kako protein sličan LysRS u korijenu vjerojatno sudjeluje u antioksidativnoj zaštiti, iako mehanizam djelovanja nije poznat. Sličan primjer dokumentiran je u *E. coli* gdje su prisutne dvije varijante enzima LysRS: varijanta kodirana konstitutivno eksprimiranim genom *lysS*, te varijanta kodirana genom *lysU* kojeg povremeno aktiviraju osim određenih nutrijenata i različite vrste stresora (toplinski šok, niski pH i anaerobni uvjeti).⁹²⁻⁹⁴ Zanimljivo je da ova druga varijanta bakterijskog enzima inducirana stresom ima mogućnost proizvoditi Ap₃A i Ap₄A signalne molekule^{95,96} što razjašnjava njenu inicijalnu ulogu u stresu.

§ 3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Standardne kemikalije

Aceton (*Kemika*), acetonitril (*Sigma*), agar (*Sigma*), agaroz (*Sigma*), akrilamid (*Sigma*), amonijev acetat (*Kemika*), amonijev hidrogenkarbonat (*Sigma*), amonijev klorid (*Kemika*), ampicilin (*Sigma*), amonijev peroksodisulfat (APS) (*Sigma*), 5-brom-4-klor-hidroksiindolil- β -D-galaktopiranozid (X-gal) (*Sigma*), cinkov klorid (*Kemika*), 1,4-bis(4-metil-5-fenil-2-oksazolil)benzen (POPOP) (*Calbiochem*), 2,5-difeniloksazol (PPO) (*Merck*), dietilpriokarbonat (DEPC) (*Sigma*), ditiotreitol (DTT) (*Sigma*), etanol (*Kemika*), ekstrakt kvasca (*BD Difco*), etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) (*Kemika*), etilenglikoltetraoctena kiselina (EGTA) (*Sigma*), fenilmetilsulfonil-fluorid (PMSF) (*Sigma*), fenol (*Kemika*), fiksir (*Kodak*), gentamicin (*Sigma*) glicin (*Sigma*), glicerol (*Kemika*), guanidin hidroklorid (*Sigma*), imidazol (*Sigma*), izopropil- β -tiogalaktozid (IPTG) (*Sigma*), jodoacetamid (*Sigma*), kalcijev karbonat (*Sigma*), kalcijev klorid (*Kemika*), kalijev acetat (*Kemika*), kalijev bikromat (*Kemika*), kalijev hidrogenfostat (*Kemika*), kalijev dihidrogenfostat (*Kemika*), kalijev hidroksid (*Kemika*), kanamicin (*Sigma*), kloridna kiselina (*Kemika*), kloramfenikol (*Sigma*), kloroform (*Kemika*), litijev acetat (*Kemika*), magnezijev acetat (*Kemika*), magnezijev klorid (*Kemika*), manitol (*Sigma*), β -merkaptotanol (*Sigma*), metanol (*Kemika*), natrijev hidroksid (*Kemika*), *N,N'*-metilenbisakrilamid (*Sigma*), *N*-(2-hidroksietil)piperazin-*N'*-2-etansulfonska kiselina (Hepes) (*Sigma*), 2-(*N*-morfolino)etansulfonska kiselina (MES) (*Sigma*), natrijev citrat (*Sigma*), natrijev dodecilsulfat (SDS) (*Sigma*), natrijev hidroksid (*Kemika*), natrijev klorid (*Kemika*), octena kiselina (*Kemika*), polietilenglikol 3350 (*Sigma*), *N,N,N,N'*-tetrametiletildiamin (TEMED) (*Sigma*), nitratna kiselina (*Kemika*), spermidin (*Sigma*), razvijatelj (*Kodak*), srebrov nitrat (*Sigma*), streptomycin (*Sigma*), toluen (*Kemika*), trifluoroctena kiselina (*Kemika*), trikloroctena kiselina (*Kemika*), tripton (*BD Difco*), Tris(hidroksimetil)-aminometan (TRIS) (*Sigma*), Tween 20 deterdžent (*Sigma*), Yeast nitrogen base without amino acids (*Difco*).

3.1.2. Aminokiseline i nukleotidi

Adenin hemisulfat (*Sigma*), adenzin trifosfat (ATP) (*Sigma*), dNTP smjesa (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (*Sigma*), aspartat (*Serva*), arginin hidroklorid (*Serva*), fenilalanin (*Serva*), histidin hidroklorid monohidrat (*Serva*), izoleucin (*Serva*), leucin (*Serva*), lizin hidroklorid (*Serva*), metionin (*Serva*), tirozin (*Serva*), treonin (*Serva*), triptofan (*Serva*), uracil (*Serva*), valin (*Serva*).

Oligo dT i *random-primed* cDNA knjižnice pripremljene su na temelju mRNA izoliranih iz klijanaca biljke *A. thaliana*, te su kao i sojevi kvasca dobiveni ljubaznošću prof. dr. sc. Wolfganga Werra i dr. sc. Pascala Reisewitza (University of Koeln, Germany).

Početnice korištene u reakcijskim smjesama naručene su od komercijalnih dobavljača (*Sigma*, *Macrogen*, *Integrated DNA technologies*).

3.1.3. Boje

Bromfenol plavilo (*Serva*), Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Merck*), 4',6-diamidino-2-fenilindol (*Sigma*), etidijev bromid (*Boehringer Mannheim*), ksilencijanол fluorofosfat (XCFF) (*Serva*), *Ponceau S* (*Sigma*), 647-NT Red dye (*Nanotemper*).

3.1.4. Enzimi i ostali proteini

Albumin goveđeg seruma (BSA) (*NEB*), *BP klonaza* (*Life technologies*), celulaza R10 (*Sigma*), DNaza I (*Promega*), DNA jednolančana iz sperme lososa (*Sigma*), kozja poliklonska antitijela za glutation-S-transferazu (*General Electrics*), lizozim (*Sigma*), *LR klonaza* (*Life technologies*), macerozim R10 (*Sigma*), mišja monoklonska antitijela za GAL4 DNA veznu domenu (*Santa Cruz*), mišja monoklonska antitijela za (His)₆-privjesak (*Roche*), *pfu* DNA-polimeraza s odgovarajućim puferom (*Thermo*), reverzna transkriptaza *Superscript III* (*Life technologies*), RNaza A (*Thermo*), *RNase out* inhibitor RNaza (*Life technologies*), *RNasin* inhibitor RNaza (*Promega*), *Taq* DNA-polimeraza s odgovarajućim puferom (*Thermo*), T4 DNA-ligaza (*Thermo*), ukupna tRNA iz *E.coli* (*Sigma*), ukupna tRNA iz *S.cerevisiae* (*Thermo*).

3.1.5. Hranjive podloge

3.1.5.1. Hranjive podloge za bakterije

Luria-Bertani (LB) tekuća hranjiva podloga: 10 g dm⁻³ tripton, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ NaCl. LB kruta hranjiva podloga: 10 g dm⁻³ tripton, 5 g dm⁻³ ekstrakt kvasca, 10 g dm⁻³ NaCl, 15 g dm⁻³ agar.

Podloge su autoklavirane 18 minuta na 121 °C, a nakon hlađenja dodani su antibiotici: ampicilin do konačne koncentracije 0,1 mg mL⁻¹, gentamicin do konačne koncentracije 0,01 mg mL⁻¹, kanamicin do konačne koncentracije 0,05 mg mL⁻¹, kloramfenikol do konačne koncentracije 0,025 mg mL⁻¹ i streptomycin do konačne koncentracije 0,01 mg mL⁻¹.

3.1.5.2. Hranjive podloge za kvasce

YPD, YPDA- kompletna tekuća hranjiva podloga za uzgoj kvasaca: 20 g dm⁻³ tripton, 10 g dm⁻³ kvašćev ekstrakt, 30 mg dm⁻³ adenin hemisulfat, 20 g dm⁻³ glukoza.

YPD, YPDA- kruta hranjiva podloga: 20 g dm⁻³ tripton, 10 g dm⁻³ kvašćev ekstrakt, agar 20 g dm⁻³, adenin hemisulfat 30 mg dm⁻³, 20 g dm⁻³ glukoza.

DO- (eng. *drop-out solution*) 10 × koncentrirana otopina: 200 mg dm⁻³ arginin hidroklorid, 300 mg dm⁻³ izoleucin, 300 mg dm⁻³ lizin hidroklorid, 500 mg dm⁻³ fenilalanin, 2000 mg dm⁻³ treonin, 300 mg dm⁻³ tirozin, 1500 mg dm⁻³ valin.

Zasebno su pripremljene 10 × koncentrirane otopine aminokiselina i suplemenata: 200 mg dm⁻³ adenin hemisulfat, 200 mg dm⁻³ histidin hidroklorid monohidrat, 1000 mg dm⁻³ leucin, 200 mg dm⁻³ metionin, 200 mg dm⁻³ triptofan, 200 mg dm⁻³ uracil.

SD- (eng. *single drop-out medium*) minimalna hranjiva podloga za uzgoj kvasaca: 6,7 g dm⁻³ *Yeast nitrogen base without amino acid*, 20 g dm⁻³ glukoza, 20 g dm⁻³ agar (za krute hranjive podloge), 10 % (v/v) 10× koncentrirane otopine DO, 10 % (v/v) 10× koncentrirane otopine odgovarajuće aminokiseline i suplementa koji nisu dio DO otopine.

Sve otopine su autoklavirane 15 minuta na 121 °C.

3.1.5.3. Hranjive podloge za biljke

Murashige i Skoog (MS) hranjiva podloga: 4,4 g dm⁻³ MS smjesa s dodanim vitaminima i MES puferom (*Duchefa*), 20 g dm⁻³ saharoza, 6 g dm⁻³ agar (za krute hranjive podloge).

U eksperimentima s abiotičkim stresorima MS hranjiva podloga suplementirana je s KCl (do konačne koncentracije 50 mol dm⁻³), manitolom (do konačne koncentracije 100 mol dm⁻³) ili NaCl (do konačne koncentracije 50 mol dm⁻³).

Svim otopinama pH je namješten na 5,7 pri sobnoj temperaturi, nakon čega su autoklavirane 18 minuta na 121 °C.

3.1.6. Kromatografske kemikalije, kolone, membrane i filmovi

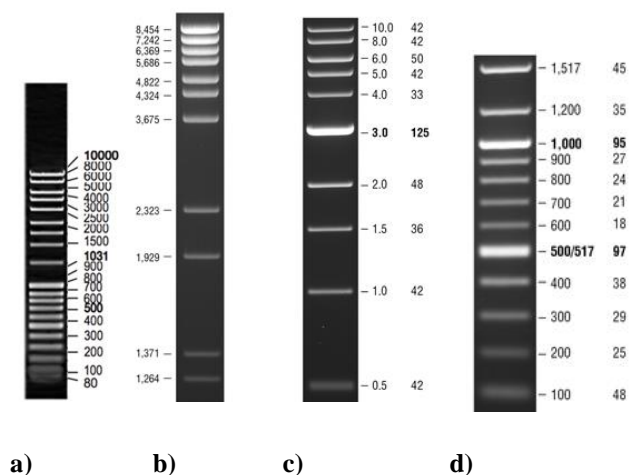
Celulozna membrana za dijalizu (*Sigma*), centrikoni *Amicon Ultra centrifugal filters* (*Millipore*), film za *western-hibridizacijsku* analizu *Carestream biomax XAR* (*Kodak*), filtracijski sustav *Corning bottle-top vacuum filter system* 0,2 µm celuloza acetat (*Sigma*), filteri s promjerom pora 0,2 µm celuloza acetat (*GE Healthcare*), filter papir *Whatman 3MM* (*GE Healthcare*), Glutation-S-transferaza agaroza (GST) (*GE Healthcare*), kolone za gel filtraciju *Superdex 200 10/300* i *Superdex 75 10/300* (*GE Healthcare*), kolone za ionsku izmjenu *MonoQ 10/10* i *MonoS 10/10* (*GE Healthcare*), najlonski filter 35-75 µm *Myracloth* (*Calbiochem*), Ni-NTA agaroza (*Qiagen*).

3.1.7. Komercijalni kompleti

Komplet za detekciju proteina u *western-hibridizacijskoj* analizi *LumiGLO* (*KPL*), komplet za izolaciju plazmidne DNA iz bakterijskih stanica *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*), komplet za izolaciju mRNA *Dynabeads Oligo (dT)₂₅* (*Life Technologies*), komplet za pročišćavanje PCR produkata *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen*), komplet za kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze *LightCycler 480 SYBR green Master I* (*Roche*).

3.1.8. Markeri veličine

1kb DNA marker (NEB), Lambda DNA HindIII Digest (Sigma), Precision Plus Protein Standards (Bio-rad).



Slika 6. DNA markeri veličine korišteni u ovom radu **a)** *MassRuler DNA Ladder Mix*⁹⁸ **b)** *λ DNA-HindIII Digest*¹¹⁷ **c)** *1 kb DNA Ladder*¹¹⁷ **d)** *100 bp DNA Ladder*¹¹⁷

3.1.9. Radioaktivno obilježeni spojevi

[¹⁴C]serin (*Perkin Elmer*)

3.1.10. Sojevi i plazmidi

3.1.10.1. Bakterija *Escherichia coli*

BL21 (F- *ompT hsdS_B (r_B-m_B-) gal dcm* (DE3) (*Novagen*): bakterijski soj za nadekspresiju gena kloniranih u vektore pET sustava (sadrže T7 promotor). Gen za T7-RNA-polimerazu dio je bakteriofaga λ DE3 koji je integriran u bakterijski genom. Transkripcija ovog gena regulirana je *lacUV5* promotorom kojeg je moguće inducirati dodavanjem IPTG-a. Većina proteazne aktivnosti u bakterijama ovog soja spriječena je mutacijama gena *lon* i *ompT* što onemogućuje proteolitičku razgradnju proteina prilikom pročišćavanja.⁹⁷

DH5 α (*supE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZ) Δ M15) *hsdR17 recA1 gyrA96 thi1 relA1*) (Novagen): bakterijski soj za kloniranje i replikaciju rekombinantnih plazmida. Mutacija gena *recA1* onemogućuje homolognu rekombinaciju što pojačava stabilnost rekombinirane DNA. Mutacijom endonukleaze I (gen *endA1*) onemogućena je nespecifična razgradnja DNA, dok mutacija Φ 80 lacZ Δ M15 omogućuje α -komplementaciju s amino-krajem β -galaktozidaze kodirane pUC vektorima.⁹⁷*

pDONR207 (*Life Technologies*): ulazni vektor u tzv. *gateway* kloniranju koje se temelji na unošenju strane DNA u vektore djelovanjem rekombinaza. Sadrži gen za rezistenciju na gentamicin, te u kazeti omeđenoj *attP* regijama gene za rezistenciju na kloramfenikol i *ccdB* protein-inhibitor giraze. Budući da se prilikom rekombinacije ova kazeta zamjenjuje heterolognom DNA, uspješnost rekombinacije moguće je utvrditi direktno praćenjem rasta bakterija na podlogama s kloramfenikolom.⁹⁸

pET28b (*Novagen*): plazmid za nadekspresiju rekombinantnog proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *T7lac* s kanamicinskom rezistencijom i malim brojem kopija. Služi za dobivanje rekombinantnog proteina s heksahistidinskim privjeskom na N- ili C-kraju radi pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima.⁹⁹

pGEX-6P-1/ pGEX-6P-2 (*GE Healthcare*): plazmidi za nadekspresiju rekombinantnog proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *tac* s ampicilinskom rezistencijom i niskim brojem kopija. Služe za dobivanje rekombinantnog proteina s GST-privjeskom na N-kraju proteina radi pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na GST-agarozima.¹⁰⁰

pPROEX Htb (*Life Technologies*): plazmid za nadekspresiju rekombinantnog proteina pod kontrolom inducibilnog promotora *trc* s ampicilinskom rezistencijom i niskim brojem kopija. Služi za dobivanje rekombinantnog proteina s heksahistidinskim privjeskom na N-kraju proteina radi pročišćavanja afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozima.⁹⁸

3.1.10.2. Kvasac *Saccharomyces cerevisiae*

AH109 (*MATa, trp 1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : : GAL1_{UAS} - GAL1_{TATA} -HIS3, GAL2_{UAS} -GAL2_{TATA} -ADE2 URA3 : : MEL1_{UAS} -LacZ MEL1*) (*Clontech*):

soj dizajniran za detekciju proteinskih interakcija metodom kvašćevih dvaju hibrida (eng. *yeast two-hybrid (Y2H)*), pri čemu se uslijed pozitivne interakcije aktiviraju geni izvjestitelji *HIS3*, *ADE2*, *MEL1*, *LacZ* što kvascu omogućuje preživljavanje na selektivnim hranjivim podlogama.¹⁰¹

Y187 (*MATa*, *URA3-52*, *HIS3-200* *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *met-*, *URA3* : : *GAL1_{UAS}* -*GAL1_{TATA}*-*LacZ* *MEL1*) (*Clontech*): soj dizajniran za detekciju proteinskih interakcija metodom Y2H. Sadrži gene izvjestitelje *MEL1*, *LacZ*.¹⁰¹

pAD-GAL4-2.1 (*Agilent Technologies*) plazmid za nadekspresiju rekombinantnog proteina u kvascu pod kontrolom konstitutivno aktivnog promotora *ADHI* s ampicilinskom rezistencijom u bakterija, nutritivnim markerom *LEU2* kod kvasaca, te niskim brojem kopija. Služi dobivanju fuzije rekombinantnog proteina i aktivacijske domene GAL4 (GAL4 AD) na njegovom N-kraju.¹⁰²

pBD-GAL4 Cam (*Agilent Technologies*) plazmid za nadekspresiju rekombinantnog proteina u kvascu pod kontrolom konstitutivno aktivnog promotora *ADHI* s kloramfenikolskom rezistencijom u bakterija, nutritivnim markerom *TRP1* kod kvasaca, te niskim brojem kopija. Služi dobivanju fuzije rekombinantnog proteina i GAL4 DNA-vezne domene (GAL4 DNA BD) na njegovom N-kraju.¹⁰²

pGADT7 AD (*Clontech*): plazmid za nadekspresiju rekombinantnog proteina u kvascu pod kontrolom konstitutivno aktivnog promotora *ADHI* s ampicilinskom rezistencijom u bakterija, nutritivnim markerom *LEU2* kod kvasaca, te niskim brojem kopija. Služi dobivanju fuzije rekombinantnog proteina i GAL4 aktivacijske domene (GAL4 AD) na njegovom N-kraju. Uloga GAL4 AD je dvojaka- sadrži SV40 nuklearni lokalizacijski signal (SV40 NLS1) što fuzijskom proteinu omogućuje ulazak u jezgru, te u neposrednoj blizini GAL4 DNA-vezne domene (GAL4 BD) sudjeluje u aktivaciji promotora gena izvjestitelja. Linkerska regija između GAL4 AD i rekombinantnog proteina sadrži hemaglutininski epitop radi lakše detekcije fuzijskog proteina antitijelima.¹⁰¹

pGBKT7 (*Clontech*): plazmid za nadekspresiju rekombinantnog proteina u kvascu pod kontrolom konstitutivno aktivnog promotora *ADHI* s kanamicinskom rezistencijom u

bakterija, nutritivnim markerom *TRP1* kod kvasaca, te niskim brojem kopija. Služi dobivanju fuzije rekombinantnog proteina i GAL4 vezne domene (GAL4 DNA BD) na njegovom N-kraju. U jezgri stanice kvasca GAL4 DNA BD se veže na promotrosku regiju gena izvjestitelja, te u neposrednoj blizini GAL4 AD djeluje kao transkripcijski aktivator.¹⁰¹

3.1.10.3. Biljka *Arabidopsis thaliana*

U istraživanjima su korištene biljke *A. thaliana* (ekotip *Columbia*) divljeg tipa i transgenične koje nadeksprimiraju SerRS-TAP, odnosno GFP-SerRS (transgenične biljke su dobivene ljubaznošću dr. sc. Nataše Bauer).

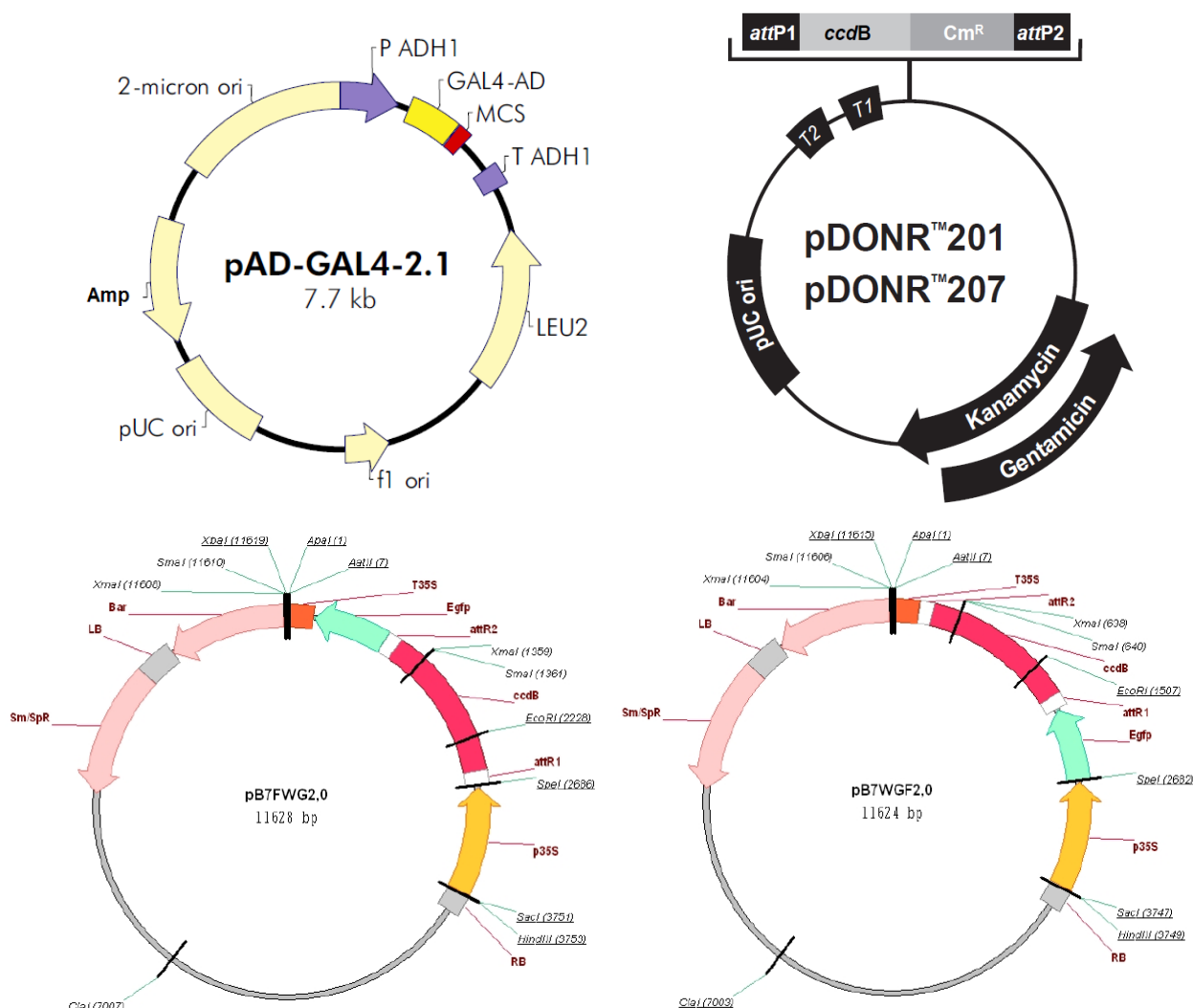
pB7FWG2.0 (*Plant System Biology, Universiteit Gent*): ciljni *gateway* vektor za nadekspresiju fuzije zelenog fluorescentnog proteina na C-kraju rekombinantnog proteina u biljkama. Sadrži gen za zeleni fluorescentni protein, streptomicinsku rezistenciju, te konstitutivni promotor 35S ispred kazete koju omeđuju regije *attR*.¹⁰³

pB7WGF2.0 (*Plant System Biology, Universiteit Gent*): ciljni *gateway* vektor za nadekspresiju fuzije zelenog fluorescentnog proteina na N-kraju rekombinantnog proteina u biljkama. Sadrži gen za zeleni fluorescentni protein, streptomicinsku rezistenciju, te konstitutivni promotor 35S ispred kazete koju omeđuju regije *attR*.¹⁰³

3.1.10.4. Biljka *Allium cepa*

Stanice pokožice luka (*A. cepa*, L.) tranzijentno su transformirane plazmidima p7FWG2.0, odnosno pB7WGF2.0 u koje je ubačen gen za SerRS u eksperimentima lokalizacije SerRS u stanici.





Slika 7. Shematski prikaz korištenih plazmidnih vektora

3.2. Metode rada s nukleinskim kiselinama

Pri radu s nukleinskim kiselinama poštovane su upute iz laboratorijskog priručnika J. Sambrook i D. Russell: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), odnosno upute proizvođača priložene kemikalijama i kompletima.

3.2.1. Izolacija plazmidne DNA

Za izolaciju plazmidne DNA korišten je *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) prema uputama proizvođača. 5 ml tekuće LB hranjive podloge s odgovarajućim antibiotikom inokulirano je

bakterijskim stanicama i uzgajano preko noći na 30 °C uz protresanje brzinom od 200 okretaja po minuti. Naredni dan provedeno je obaranje stanica centrifugiranjem 5 minuta na $10\,000 \times g$, te je uklonjen supernatant. Talog bakterijskih stanica resuspendiran je u 250 μL otopine P1 (50 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH = 8.0, 10 mmol dm^{-3} EDTA, 100 $\mu\text{g dm}^{-3}$ RNaza A). Dodatkom uz miješanje 250 μL otopine P2 (200 mmol dm^{-3} NaOH, 1 % (w/v) SDS) uslijedila je liza bakterijskih stanica, te denaturacija proteina i genomske DNA, koji su dodatkom uz miješanje otopine N3 (4,2 mol dm^{-3} guanidin hidroklorid, 0,9 mol dm^{-3} kalijev acetat pH = 4.8), te centrifugiranjem na $10\,000 \times g$ 10 minuta istaloženi. Bistri supernatant otopine plazmidne DNA prebačen je u mini-kromatografsku kolonu radi vezanja nukleinskih kiselina na punilo, te je sve centrifugirano 1 minutu na $10000 \times g$. Kolona je dalje ispirana dodavanjem otopine 500 μL PB (5 mol dm^{-3} guanidin hidroklorid, 30 % (v/v) izopropanol) uz centrifugiranje na $10\,000 \times g$ 1 minutu, odnosno dodavanjem 700 μL otopine PE (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH = 7.5, 80 % (v/v) etanol) uz centrifugiranje na $10\,000 \times g$ 1 minutu. Micanje rezidualne tekućine iz kolone postignuto je centrifugiranjem na $10\,000 \times g$ 2 minute. Elucija plazmidne DNA postignuta je apliciranjem 30 μL otopine EB (10 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH = 8.5). Ovako pripremljena otopina plazmidne DNA pohranjena je na -20 °C, a uspješnost izolacije, te čistoća uzoraka provjerena je elektroforezom na gelu agaroze i spektrofotometrijskom analizom. Koncentracija dvolančane DNA određena je mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm na način da je jedna jedinica A_{260} (1 $A_{260}\text{U}$) definirana kao ona količina DNA koja otopljena u 1 ml daje $A_{260} = 1$. Masa 50 μg čiste dvolančane DNA odgovara 1 $A_{260}\text{U}$. Čistoća uzorka određena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 230 i 280 nm. Apsorbancija pri 230 nm upućivala je na onečišćenje organskim tvarima, dok je apsorbancija na 280 nm upućivala na onečišćenje proteinima. Uzorak plazmidne DNA mogao se smatrati čistim ukoliko je apsorbancijski omjer 260 nm / 280 nm imao vrijednost 1,8 - 2,0, a omjer 260 nm / 230 nm vrijednost veću od 1,8.¹⁰⁴ Koncentracija i čistoća plazmidne DNA određene su spektrofotometrom NanoDrop1000 na kojemu je moguće aplicirati vrlo male volumene analita (2 μL za jedno mjerenje).

Izolacija plazmidne DNA iz kvasaca provedena je prema protokolu za izolaciju plazmidne DNA iz bakterija uz djelomične modifikacije. Zasebna kolonija kvasca nasadena je u 5 mL -Leu selektivnog tekućeg hranjivog medija, te je otopina inkubirana preko noći na 30 °C uz protresanje brzinom od 200 okretaja po minuti. Nakon 24 sata stanice su oborene

centrifugiranjem 5 minuta na $5000 \times g$, te je talog resuspendiran u 250 μL pufera P1. Potom je dodano 100 μL staklenih kuglica G-8772 (*Sigma*), smjesa je vorteksirana 5 minuta kako bi se stanice kvasca efikasno razorile, ostavljena stajati do potpune sedimentacije svih staklenih kuglica, te je odvojen supernatant i pomiješan s 250 μL otopine P2 uz miješanje. Smjesi je uz miješanje dodano 350 μL otopine N3, te je sve centrifugirano 10 minuta na $10\,000 \times g$. Bistri supernatant prebačen je u mini-kromatografsku kolonu, te je nastavljeno s koracima ispiranja i elucije identično kao u izolaciji plazmidne DNA iz bakterija.

3.2.2. Izolacija mRNA

U sve puferu i vodu korištenu za izolaciju mRNA prethodno je dodan dietilpirokarbonat (DEPC, 0,1% (v/v)) s ciljem inaktivacije RNaza. Nakon prekonoćne inkubacije, DEPC je termički razgrađen autoklaviranjem 30 minuta na $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tarionici, kao i sav pribor korišten u izolaciji mRNA prethodno je ohlađen u tekućem dušiku. Biljke su uzgajane 7 dana na krutim MS podlogama u uvjetima dugog dana (16 sati svjetla, 8 sati tame) nakon čega su uronjene u tarionik s tekućim dušikom i homogenizirane u prah. 0,1 g praha pomiješano je s 1,5 mL komercijalno dostupne otopine gvanidin tiocijanata i fenola (*TRIzol Reagent, Molecular Research Center, Inc.*), smjesa je vorteksirana 10 minuta, te potom centrifugirana na $12\,000 \times g$, 10 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant je odvojen i pomiješan s 300 μL kloroforma, vorteksiran 10 minuta i centrifugiran na $12\,000 \times g$ 15 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon centrifugiranja jasno su zamijećene tri faze otopine različitih gustoća: donja organska koja je sadržavala lipide i proteine, srednja koja je sadržavala DNA i gornja vodena s otopljenom RNA. 800 μL vodene faze pažljivo je odvojeno i pomiješano s 320 μL otopine visoke ionske jakosti ($1,2\text{ mol dm}^{-3}\text{ NaCl}$, $0,8\text{ mol dm}^{-3}\text{ C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$), te 320 μL izopropanola. Nakon inkubacije na ledu 10 minuta, provedeno je centrifugiranje pri $12\,000 \times g$ 15 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant je uklonjen, a dobiveni talog RNA radi daljnjeg pročišćavanja resuspendiran sa 175 μL 75% (v/v) etanola i centrifugiran pri istim uvjetima 5 minuta. Novi talog je osušen na zraku, resuspendiran u 100 μL vode uz dodatak 10 μL natrijevog acetata (1 mol dm^{-3}) i 250 μL etanola. Smjesa je ostavljena na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći. Naredni dan otopina je centrifugirana na $12\,000 \times g$ 30 minuta na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobiveni talog RNA resuspendiran je u vodi, te su mu spektrofotometrijski određene čistoća i koncentracija. Čista RNA pokazuje vrijednosti $A_{260} / A_{280} = \sim 2,0$, odnosno $A_{260} / A_{230} = 2,0 - 2,2$.¹⁰⁵

Za dobivanje vrlo čiste mRNA korišten je komercijalni komplet *Dynabeads Oligo (dT)₂₅* (*Life Technologies*) uz praćenje naputaka proizvođača. Metoda podrazumijeva izdvajanje mRNA iz staničnog lizata vezanjem mRNA na oligo dT slijedove fiksirane za površinu magnetnih kuglica, koje se dalje separiraju od ostatka smjese djelovanjem magnetnog polja.¹⁰⁶

3.2.3. Elektroforeza nukleinskih kiselina na gelu agaroze

Smjer i brzina gibanja nukleinskih kiselina u električnom polju određena je ukupnim nabojem, veličinom i oblikom molekula nukleinskih kiselina. Prisustvo fosfatnih skupina čini nukleinske kiseline pri neutralnom pH negativno nabijenim molekulama, koje se u elektrokemijskom članku gibaju prema pozitivnoj anodi tako da manje molekule putuju brže od velikih. U slučaju postojanja molekula jednakih veličina brže će se gibati kompaktne superzavijene molekule naspram linearnih, odnosno najsporijih kružnih relaksiranih molekula. Veličina molekula uvjetuje i gustoću gela agaroze, na način da je gustoća gela obrnuto proporcionalna veličini molekula. Za optimalno razdvajanje i analizu nukleinskih kiselina u ovom istraživanju korišteni su 1 % (w/v) gelovi agaroze pripremljeni otapanjem 3 g agaroze u 300 mL pufera TAE (40 mmol dm⁻³ Tris-base, 20 mmol dm⁻³ octena kiselina, 1 mmol dm⁻³ EDTA pH = 8) u kojeg je dodan etidijev bromid do koncentracije 50 µg dm⁻³. Prije nanošenja na gel, uzorci su pomiješani s puferom za nanošenje (0,25 % (w/v) bromfenolno plavilo, 0,25 % ksilencijanoloformilformil, 0,01 mol dm⁻³ EDTA pH = 8, 3 % (w/v) glicerol). Glicerol povećava specifičnu gustoću uzoraka i omogućuje njihov ulazak u jažice gela, dok bromfenolno plavilo i ksilencijanoloformilformil omogućuju vizualno praćenje napretka elektroforeze. Elektroforeza je provedena u TAE puferu u aparaturi za horizontalnu elektroforezu *Sub Cell GT Cell* (*Bio-Rad*) pri naponu od 120 V na sobnoj temperaturi. Vizualizacija DNA postignuta je osvjetljavanjem gela agaroze UV zračenjem (na 235 nm apsorbira DNA i prenosi energiju etidijevom bromidu, dok na 302 i 366 nm apsorbira sam etidijev bromid) pri čemu dolazi do fluorescencije etidijevog bromida interkaliranog u dvolančanu strukturu molekule DNA (etidijev bromid emitira u vidljivom dijelu spektra na 590 nm žuto-narančasto zračenje).¹⁰⁸ Gelovi agaroze osvjetljeni su UV zračenjem valne duljine 302 nm, te fotografirani korištenjem sustava *MiniBIS Imaging systems* (*DNR, Bio-Imaging Systems Ltd.*). Veličine DNA molekula određene su usporedbom s markerima veličine: DNA faga λ pocijepana s endonukleazom HindIII i 1 kb marker veličine (*NEB*).

3.2.4. Transformacija bakterijskih stanica

Plazmidna DNA unošena je u bakterijske stanice elektroporacijom. Kratkim i snažnim električnim pulsom izaziva se kratkotrajna promjena strukture stanične sijenke bakterija što rezultira povećanom permeabilnošću za molekule DNA. Korišten je uređaj *Gene Pulser (Bio-Rad)* u postavkama napona od 2 500 V i kapaciteta od 25 μF , dok je nadzor pulsa kontroliran uređajem *Pulse Controller Unit (Bio-Rad)* s postavkom otpora od 200 Ω . Transformacija je provedena dodavanjem 1-50 ng plazmidne DNA ohlađenim elektrokompetentnim stanicama *E. coli*, stavljanjem smjese u prethodno ohlađene elektrokivete i puštanjem električnog pulsa od 2,5 kV/cm pri čemu je vrijeme pražnjenja kondenzatora bilo 4-5,4 ms. Neposredno nakon elektroporacije stanice su resuspendirane u 1 ml LB medija sobne temperature i inkubirane 1 sat na 37 °C. Po završetku inkubacije određeni volumen suspenzije stanica nanesen na krute LB hranjive medije u koje je prethodno dodan odgovarajući antibiotik, te je provedena prekončna inkubacija na 37 °C pri čemu su na selektivnim podlogama rasle samo bakterije koje su primile plazmid s genom za rezistenciju na odgovarajući antibiotik.

3.2.5. Transformacija stanica kvasca

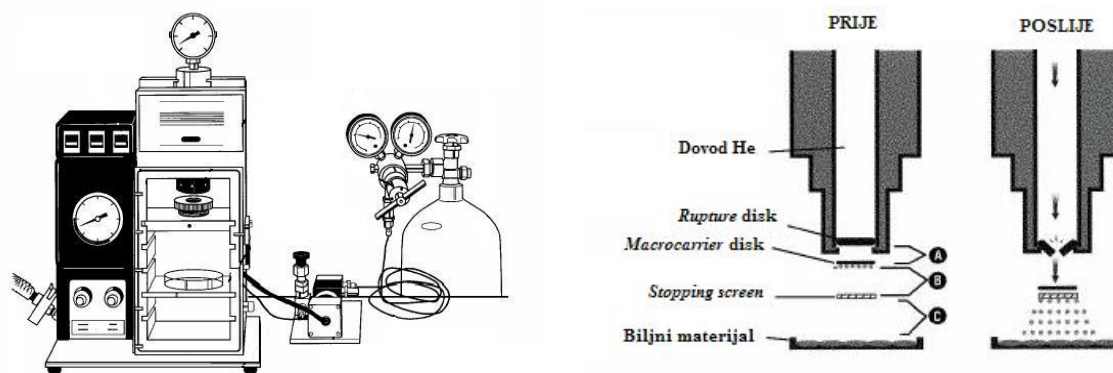
20 ml YPDA medija inokulirano je stanicama kvasca, te ostavljeno preko noći na 30 °C uz protresanje brzinom od 200 okretaja po minuti. Rast kulture praćen je mjerenjem optičke gustoće medija pri 600 nm (OD_{600}). Naredni dan nakon postizanja vrijednosti OD_{600} između 0,8-1,5 stanice su oborene centrifugiranjem 3 minute na $1\,200 \times g$ na sobnoj temperaturi, te isprane s 40 mL sterilne vode i ponovno oborene pri istim uvjetima. Talog je resuspendiran u 0,5 mL sterilne vode, te mu je pazeći na redoslijed dodano 240 μL 50 % (w/v) polietilenglikola 3350 (PEG 3350), 36 μL litijevog acetata (1 mol dm^{-3}), 25 μL jednolančane DNA (2 g dm^{-3}) i 1-10 μg plazmidne DNA. PEG pospješuje efikasnost transformacije stanica najvjerojatnije dovođenjem smjese jednolančane i plazmidne DNA u prostornu bliskost sa staničnom membranom, te povećanjem njene permeabilnosti. Litijevi ioni maskiraju negativan naboj fosfatnih skupina na molekuli DNA i u fosfolipidnom dvosloju membrane i time smanjuju odbijanja nabijenih ostataka. Jednolančana DNA vjerojatno smanjuje pretjerano "lijepljenje" plazmidne DNA na membranu, dok u citoplazmi služi kao "žrtveni balast" DNazama čime se ostavlja veća vjerojatnost preživljavanju plazmidne DNA.¹⁰⁷ Ovako pripremljena smjesa je pažljivo promiješana okretanjem, inkubirana 30 minuta na 30 °C uz

protresanje brzinom od 50 okretaja po minuti, te izložena toplinskom šoku u vodenoj kupelji zagrijanoj na 42 °C kroz 15 minuta. Po završetku inkubacije, stanice su oborene centrifugiranjem na $1200 \times g$ 3 minute na sobnoj temperaturi. Talog stanica je resuspendiran u 50 μL sterilne vode.

3.2.6. Transformacija biljnih stanica

3.2.6.1. Transformacija biljnih stanica bombardiranjem mikroprojektilima (biolistika)

U 50 μL vodene otopine fino dispergiranih čestica zlata (20 g dm^{-3} , $\varnothing = 0,6 \mu\text{m}$, *Bio-Rad*) dodano je 8 μL otopine plazmidne DNA ($0,5 \text{ g dm}^{-3}$), te vorteksirano. Potom je u smjesu istovremeno dodano 50 μL otopine CaCl_2 ($2,5 \text{ mol dm}^{-3}$), 20 μL otopine spermidina ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) i vorteksirano. Čestice zlata s vezanom plazmidnom DNA ispiru se tri puta sa 150 μL 100 % (v/v) etanola uz centrifugiranje od $1000 \times g$ 1 minutu. Konačni talog resuspendiran je u 85 μL 100 % (v/v) etanola. S ciljem ostvarivanja prolazne ekspresije gena od interesa, biljne stanice transformirane su korištenjem *Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System* (*Bio-Rad*). Osmam μL prethodno pripremljene otopine nanosi se na tzv. *macrocarrier* disk, inkubira na zraku dok otopina ne evaporira ostavljajući čestice zlata zalijepljene za disk, nakon čega se disk umeće u aparaturu prikazanu na slici 8. Prije pokretanja postupka bombardiranja tlak radne komore snižen je na otprilike 88 kPa radi umanjivanja trenja prilikom gibanja mikroprojektila-čestica zlata na putu prema biljnom materijalu. Bombardiranje je omogućeno propuštanjem struje plina helija u aparaturu na tzv. *rupture* disk do vrijednosti tlaka pucanja diska ($\sim 7,69 \text{ MPa}$), udarni val plina potom udara u *macrocarrier* disk i prenosi ga na tzv. *stopping screen* pri čemu se čestice zlata s plazmidnom DNA otpuštaju prema biljnom materijalu udaljenom 9 cm u kojeg penetriraju. Nakon transformacije biljni materijal inkubiran je u mraku preko noći.



Slika 8. Aparatura za transformaciju biljnih stanica bombardiranjem mikroprojektilima *Biolistics PDS-1000/He Particle Delivery System* (Bio-Rad) (preuzeto i prilagođeno iz¹¹⁵).

3.2.6.2. Transformacija protoplasta

Izolacija i transformacija protoplast provedena je prateći uhodani protokol.¹³⁷ Sakupljeni su listovi 2 tjedna starih biljaka *Arabidopsis thaliana* (1 g), izrezani na komadiće dimenzija 1×1 mm, te je sve uronjeno u otopinu za enzimsko uklanjanje stanične stijenke: 1,5 % (w/v) celulaza R10, 0,4 % (w/v) macerozim R10, $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ manitol, 20 mmol dm^{-3} KCl, 20 mmol dm^{-3} MES pH = 5.7, 10 mmol dm^{-3} CaCl₂, 1 mmol dm^{-3} DTT, 0,1 % (w/v) BSA i ostavljeno 30 minuta u posudi pod podtlakom. Uslijedila je dodatna inkubacija uz protresanje brzinom od 40 okretaja po minuti u trajanju od 1,5 sati, te završno protresanje brzinom od 80 okretaja po minuti u trajanju 5 minuta. Otopina protoplasta filtrirana je kroz najlonski filter veličine pora od 35 - 75 μm (*Miracloth*, *Calbiochem*) kako bi se protoplasti odvojili od nečistoća, te centrifugirana u tubi okruglog dna na $100 \times g$ 1 minutu. Talog protoplasta ispran je s 10 mL otopine za ispiranje sastava: 145 mmol dm^{-3} NaCl, 125 mmol dm^{-3} CaCl₂, 5 mmol dm^{-3} KCl, 2 mmol dm^{-3} MES pH = 5.7 i potom centrifugiran pri istim uvjetima. Nakon uklanjanja supernatanta, a prije transformacije, protoplasti su resuspendirani u 2 mL otopine sastava: $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ manitol, 15 mmol dm^{-3} MgCl₂, 4 mmol dm^{-3} MES pH = 7.5, i ostavljeni 30 minuta na ledu. Broj protoplasta u talogu određen je mikroskopijski brojanjem u *Fuchs-Rosenthal* komori. Dubina komore iznosi 0,2 mm, prekrivena je mrežicom koju ocrta 16 velikih kvadrata dimenzija 1×1 mm, a svaki od njih sastavljen je od novih 16 kvadrata dimenzija $0,25 \times 0,25$ mm. Ukupan broj izoliranih protoplasta u uzorku dobiven je aproksimacijom s obzirom na broj protoplasta u nekoliko velikih kvadrata (najčešće četiri). Za reakciju transformacije uzimano je ugrubo oko 2×10^4 protoplasta u volumenu od 100 μL ,

15 μL plazmidne DNA (20-40 μg) i 115 μL otopine sastava: 40 % (w/v) PEG 3350, 0,2 mol dm^{-3} manitol, 0,1 mol dm^{-3} CaCl_2 . Reakcijska smjesa inkubirana je 30 minuta uz povremeno protresanje rukom, nakon čega je dodan 1 mL otopine za ispiranje. Smjesa je centrifugirana na $100 \times g$ 3 minute, talog je resuspendiran u 200 μL otopine za ispiranje i inkubiran preko noći u mraku na sobnoj temperaturi.

3.2.7. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction, PCR*) služi umnožavanju ciljanog fragmenta molekule DNA *in vitro* u ponavljajućim ciklusima. Nakon inicijalne pripreme termičke denaturacije na 95 °C, prvi korak reakcije započinje na 95 °C denaturacijom molekula DNA, zatim se temperatura snižava do temperature vezanja početnica na kalup DNA (temperatura mekšanja, 40-65 °C), te završno u trećem koraku pri temperaturi od 72 °C slijedi sinteza novih dvolančanih molekula DNA. Ova tri koraka ponavljaju se određen broj ciklusa s time da u svakom sljedećem ciklusu nastaje dvostruko veća količina dvolančanih molekula DNA u odnosu na prethodni, odnosno u n ciklusa nastaje 2^n kopija ciljne DNA. U reakciji se koristi termostabilna DNA-polimeraza koja je sposobna ostati stabilna i aktivna i na visokim radnim temperaturama.

PCR je u ovom istraživanju korišten za kloniranje kodirajućih sljedova od interesa u odgovarajuće plazmidne vektore radi ostvarivanja ekspresije proteina sa ili bez privjeska i njihovog daljnjeg pročišćavanja i kinetičke, odnosno biofizičke analize. Također, kombinacijom reakcije reverzne transkriptaze i PCR-a (RT-PCR) molekule mRNA uspješno su prevedene u molekule cDNA. Primjenjivane su i druge strategije PCR reakcija -PCR na bakterijskim kolonijama (tzv. kolonijski PCR) koji se od uobičajenog PCR-a razlikuje po produženoj inicijalnoj denaturaciji kako bi se stanice efikasno razorile i oslobodila DNA, a korišten je za provjeravanje prisutnosti kodirajućeg sljeda od interesa nakon kloniranja i transformacije bakterijskih stanica. S ciljem sprječavanja nastajanja nespecifičnih produkata korišten je tzv. *touchdown* PCR -temperatura drugog koraka u početku cikličke reakcije PCR-a značajno je viša od temperature pri kojoj se početnice lijepe na kalup, te se tijekom svakog idućeg ciklusa postepeno smanjuje po 1 °C dok se ne dosegne odgovarajuća temperatura lijepljenja početnica na kalup.

Za optimiranje uvjeta PCR-a, kao i u slučaju RT-PCR i kolonijskog PCR-a korištena je *Taq* DNA-polimeraza, dok su za reakcije kloniranja korištene DNA-polimeraze s niskom stopom umetanja krivo sparenih baza, odnosno mogućnošću popravka krivo sparenih baza 3'-5' egzonukleaznom aktivnošću poput *Pfu* DNA-polimeraze i *Phusion* DNA-polimeraze.

Tablica 3. Početnice korištene u kloniranju gena od interesa za ekspresiju proteina, skraćenih verzija proteina, te za istraživanje lokalizacije SerRS u stanici.

Naziv početnice	T _m / °C	GC / %	Nukleotidni slijed 5'-3'
SRSATN	70,2	41,9	GAGAGAGAGCCATGGTGGATATCAATCTATTTTC
SRSATC	75,9	48,4	GAGAGAGGGATCCTCAAGCTTTTCGATTTCTTCC
ATCEAGC	84,1	55,5	GAGAGAGCGGCCGAGCTTTTCGATTTCTTCCCTTG
BEN1F	76,1	48,5	GAGAGAGGGATCCATGGTGAGAGAAGAACAAGAAG
BEN1R	75,5	47,0	GAGAGAGCTCGAGTTAAAGAAATCCCCCTTGCTTG
B2GlyF	76,4	56,25	GAGAGAGCCATGGGAGGAGAGAGAAAGCTGCT
ATCLF	83,9	49,0	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGGCGGAGAGACGTTTTTG
ATCLR	81,7	47,0	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTCAAGCTTTTCGATTTCTTCC
ATCTAPN	74,0	35,0	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGTTGGATATCAATCTATTTTC
ATCTAPC	77,0	42,0	ACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTAGCTTTTCGATTTCTTCCCTTG
BD37F	76,4	56,2	GAGAGAGCCATGGGGTTGGTTTGTGTAACGGG
BD37CR	76,6	51,4	GAGAGAGCTCGAGAAGAAATCCCCCTTGCTTGACAG
BD37NR	75,5	47,2	GAGAGAGCTCGAGTTAAAGAAATCCCCCTTGCTTGAC
ATCDCR	82,6	69,7	GAGAGAGGCGGCCGAGCAACTACGGGCTTGGC
ATCDCCF	74,1	47,0	GAGAGAGCCATGGGTAATTGGTCCATGATCTG
ATCDCCR	78,9	57,1	GAGAGAGGCGGCCGCTCAAGCTTTTCGATTTCTTCC
ATCKDR	83,5	66,67	GAGAGAGGCGGCCGCTCAAGCAACTACGGGCTTGGC
ATCCCR	81,1	59,4	GAGAGAGGCGGCCGCTCAACCAACTTGCTCCAACCTG
EF2F	74,5	43,2	GAGAGAGGAATTCTGATGGTGAAGTTTACAGCTGATG
EF2R	78,9	55,5	GAGAGAGGCGGCCGCTTAAAGCTTGTCTTCGAACTC
PPF	76,5	52,9	GAGAGAGGGATCCATGTTGGCTATCTTCCACGAG
PPR	81,2	61,1	GAGAGAGGCGGCCGCTCAGAGAGACCAATTGGCTTC
GSTF	75,4	48,5	GAGAGAGGGATCCATGGCAGGTATCAAAGTTTTCG
GSTR	82,3	63,8	GAGAGAGGCGGCCGCTCACTGAACCTTCTCGGAAGC
L91F	74,5	43,2	GAGAGAGGAATTCTGATGAAGACGATTTCTTCTCCG
L91R	81,1	57,8	GAGAGAGGCGGCCGCTCATTCTTCTCTACGATCTTGC
67750296	54,4	41,7	CCTCAGTTTCAGCTACCTTCAATA
67750297	53,6	47,6	CAGCTTCTTCGATGAAAGACC
67750298	53,9	34,6	AAGAACTCTGAAGATTTTACCAAGC
67750299	53,3	42,1	TTTTTCGAGCTGCATCAT
ACT2F	59,0	45,0	ATGGCTGAGGCTGATGATATTC
ACT2R	56,1	45,0	GCCTTTGATCTTGAGAGCTTAG
GAPDHF	57,9	53,0	TGGGAAGCTGGTCATCAAC
GAPDHR	59,0	45,0	GCATCACCCCATTTGATGTT
ATCTAPC	75,14	36,0	ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCG ATG TTG GAT ATC AAT CTA TTT C

Reakcije su provedene u instrumentu *T100 Thermal cycler* (Bio-Rad) u ukupnom volumenu od 25 µL za slučajeve optimiranja reakcijskih uvjeta, provjere kvalitete početnica, te kolonijskog PCR-a, odnosno u ukupnom volumenu od 100 µl u slučajevima kloniranja. Sastav i karakteristike početnica prikazane su u tablici 3., odnosno sastav reakcijskih smjesa u tablici 4. Uspješnost lančane reakcije polimeraze provjeravana je elektroforezom produkata na 1 % (w/v) gelu agaroze.

Tablica 4. Sadržaj korištenih smjesa lančane reakcije polimeraze.

PCR reakcija s <i>Taq</i> DNA-polimerazom	Početna koncentracija	Radna koncentracija
Smjesa dNTP-ova (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 mmol dm ⁻³	0,2 mmol dm ⁻³
MgCl ₂	25 mmol dm ⁻³	1,5 mmol dm ⁻³
Komercijalni pufer za <i>Taq</i> DNA-polimerazu (100 mmol dm ⁻³ Tris-HCl pH = 8,8, 10 mmol dm ⁻³ KCl, 0,8 % (w/v) Nonidet P40) (<i>Thermo</i>)	10 × koncentriran	1 × koncentriran
<i>Taq</i> DNA-polimeraza (<i>Thermo</i>)	5 U* / µL	0,1 U / µL
Napredna početnica	20 µmol dm ⁻³	1 µmol dm ⁻³
Povratna početnica	20 µmol dm ⁻³	1 µmol dm ⁻³
DNA kalup	5 ng µL ⁻¹	0,25 ng µL ⁻¹
PCR reakcija s <i>Pfu</i> DNA-polimerazom	Početna koncentracija	Radna koncentracija
Smjesa dNTP-ova (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 mmol dm ⁻³	0,2 mmol dm ⁻³
Komercijalni pufer za <i>Pfu</i> DNA-polimerazu s dodanim MgSO ₄ , (<i>Thermo</i>)	10 × koncentriran	1 × koncentriran
<i>Pfu</i> DNA-polimeraza (20 mmol dm ⁻³ Tris-HCl pH = 8,8, 10 mmol dm ⁻³ NH ₄ SO ₄ , 10 mmol dm ⁻³ KCl, 0,1 g dm ⁻³ BSA, 0,1 % (w/v) Triton X-100, 2 mmol dm ⁻³ MgSO ₄) (<i>Thermo</i>)	2,5 U / µL	0,025 U / µL
Napredna početnica	100 µmol dm ⁻³	1 µmol dm ⁻³
Povratna početnica	100 µmol dm ⁻³	1 µmol dm ⁻³
DNA kalup	5 ng µL ⁻¹	0,25 ng µL ⁻¹
PCR reakcija s <i>Phusion</i> DNA-polimerazom	Početna koncentracija	Radna koncentracija
Smjesa dNTP-ova (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 mmol dm ⁻³	0,2 mmol dm ⁻³
Komercijalni pufer za <i>Phusion</i> DNA-polimerazu (<i>NEB</i>)	5 × koncentriran	1 × koncentriran
<i>Phusion</i> DNA-polimeraza (<i>NEB</i>)	2 U / µL	0,02 U / µL
Napredna početnica	100 µmol dm ⁻³	1 µmol dm ⁻³
Povratna početnica	100 µmol dm ⁻³	1 µmol dm ⁻³
DNA kalup	5 ng µL ⁻¹	0,25 ng µL ⁻¹

* U (eng. *unit*): jedinica aktivnosti koja se definira kao ona količina enzima koja katalizira ugradnju 10 nmol dNTP-a u polinukleotidni lanac kroz 30 minuta na 72 °C.

Tablica 5. Uvjeti provedenih lančanih reakcija polimeraze.

	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	0,5 / 10 (<i>colony</i> PCR)	1
Denaturacija	95	0,5	30
Lijepljenje početnica na kalup	48-60	0,5	30
Sinteza novih lanaca	72	0,5-6**	30
Završna sinteza	72	10	1

** Ovisno o duljini PCR produkta i brzini elongacije za pojedinu DNA-polimerazu.

Tablica 6. Reakcijski parametri i opisi proteina za korištene konstrukte.

Konstrukt	Duljina gena / genskog fragmenta (pb)	Opis proteina	Početnice	Temperatura lijepljenja početnica na kalup / °C
SerRS	1356	cjeloviti protein bez privjeska	SRSATN SRSATC	50
SerRS-His	1374	cjeloviti protein s (His) ₆ na C-kraju	SRSATN ATCEAGC	50
BEN1	1095	cjeloviti protein s GST ili His privjeskom na N-kraju	BEN1F BEN1R	48
SerRSAC-His	1329	uklonjeno zadnjih 9 aminokiselina na C-kraju proteina (dodan (His) ₆ privjesak na C-kraju)	SRSATN ATCDCR	50

SerRSAC	1329	uklonjeno zadnjih 9 aminokiselina na C-kraju proteina (bez privjeska)	SRSATN ATCKDR	47
His-ANSerRS	1065	uklonjeno prvih 97 aminokiselina (dodan (His) ₆ na N-kraj)	ATCDCCF ATCDCCR	50
His-ANSerRSAC	1038	uklonjeno prvih 97 aminokiselina i 9 zadnjih (dodan (His) ₆ na N-kraj)	ATCDCCF ATCKDR	47
NSerRS	291	tzv. <i>coiled coil</i> domena, prvih 97 aminokiselina (dodan (His) ₆ na N-kraj)	SRSATN ATCCCR	47
His-ANBEN1	984	uklonjeno prvih 37 aminokiselina s N-kraja (dodan (His) ₆ privjesak na N-kraju)	BD37F BD37NR	Touchdown PCR 60→50 Phusion DNA-polimeraza
ANBEN1-His	984	uklonjeno prvih 37 aminokiselina s N-kraja (dodan (His) ₆ privjesak na C-kraju)	BD37F BD37CR	50
His-AN'BEN1	1044	uklonjeno prvih 17 aminokiselina s N-kraja	B2GlyF BD37NR	50
Elongacijski faktor 2 (EF2)	2958	cjeloviti protein s (His) ₆ na N-kraju	EF2F / EF2R	48
Protein nepoznate funkcije (AT4G27450.1) (PNF)	753	cjeloviti protein s (His) ₆ na N-kraju	PPF / PPR	48
Glutation-S-transferaza (GST)	693	cjeloviti protein s (His) ₆ na N-kraju	GSTF / GSTR	48
Ribosomski protein L9-1	585	cjeloviti protein s (His) ₆ na N-kraju	L91F / L91R	48
C-kraj SerRS	78	24 završne aminokiseline	ATCLF ATCLR	55
SerRS za Gateway kloniranje	1404	SerRS s <i>att</i> regijama za kloniranje u Gateway pDONR207	ATCTAPC ATCLR	50

3.2.7.1. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (eng. *quantitative polymerase chain reaction*, *qPCR*) temelji se na principima klasične lančane reakcije polimeraze, no dodatno omogućuje praćenje nastajanja i određivanje količine nastalog produkta u realnom vremenu. Ovo je moguće postići na dva načina: upotrebom fluorofora koji fluoresciraju kad se interkaliraju u dvolančanu molekulu DNA (tzv. *SYBR Green* tehnologija) ili korištenjem specifičnih DNA proba sastavljenih od oligonukleotida obilježenih fluoroforom na jednom kraju i njegovim inhibitorom na drugom. Kada je proba vezana za komplementarnu regiju jednolančane DNA, fluorofor i inhibitor su u neposrednoj blizini jedan naspram drugoga, te ne dolazi do fluorescencije. Nakon što *Taq* DNA-polimeraza sintetizirajući novi lanac naiđe na probu,

dovede do njene degradacije, te udaljavanja fluoroforma od inhibitora, izaziva se aktivacije fluorescencije (tzv. *TaqMan* tehnologija).¹⁰⁸

U ovom radu korištena je *SYBR Green* tehnologija za istraživanje razine ekspresije gena od interesa na uređaju *LightCycler 480 (Roche)*. Za analizu ekspresije gena koji kodira za SerRS korištene su početnice 67750298 i 67750299, za analizu ekspresije gena koji kodira za BEN1 korištene su početnice 67750296 i 67750297, te početnice za tzv. *housekeeping* gene (gene konstitutivno eksprimirane u istraživanim tkivima) GAPDHF i GAPDHR (gliceraldehi-3-fosfat-dehidrogenaza), odnosno ACT2F i ACT2R (aktin-2). Molekule mRNA izolirane su prema ranije opisanom protokolu, očišćene od ostataka genomske DNA reakcijom DNaze I i prevedne u cDNA reakcijom reverzne transkriptaze. Koncentracija cDNA određena je spektrofotometrijski, te je za reakciju qPCR-a uzimana količina od 1 µg. U svakoj qPCR reakciji-eksperimentu napravljena su tri mjerenja za svaki uzorak (tehnički triplikat), te su sve reakcije odvojeno ponavljane tri puta (biološki triplikat). Efikasnost qPCR reakcije određena je računalno u programu *LinRegPCR*.

Tablica 7. Uvjeti kvantitativne lančane reakcije polimeraze.

	Temperatura / °C	Trajanje ciklusa / min	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	7	1
Denaturacija	95	0,25	40
Lijepljenje početnica na kalup	60	0,25	40
Sinteza novih lanaca	72	0,25	40

3.2.8. Restriksijske endonukleaze

Restriksijske endonukleaze su enzimi koji specifično prepoznaju i cijepaju molekulu DNA ostavljajući tzv. ljepljive ili tupe krajeve dvolančanih struktura. Ovako pocijepane molekule DNA mogu se reakcijom DNA-ligaze spajati s identično pocijepanim molekulama odgovarajućeg vektora. U ovom istraživanju korištene su restriksijske endonukleaze tipa II koje prepoznaju i cijepaju palindromske sljedove, te su kao takve vrlo prikladne za kontrolirano kloniranje gena od interesa u odgovarajuće vektore. U probnim i kontrolnim reakcijama korištena je DNA u količinama od 0,5-1 µg, dok su za potrebe kloniranja korištene količine od 1,5-2 µg, te enzim u koncentraciji od 800 U ml⁻¹ (U: jedinica (eng. *unit*), 1 U definira se kao ona količina enzima potrebna za cijepanje 1 µg DNA faga λ u sat vremena pri

37 °C u reakcijskom volumenu od 50 µL). Za svaku restriksijsku endonukleazu odabran je odgovarajući komercijalni pufer (*NEB*) prema uputama proizvođača, te je dodavana BSA do konačne koncentracije od 0,1 g dm⁻³. Reakcijsko vrijeme bilo je 3-4 sata, nakon čega je reakcija terminirana inkubacijom 10 minuta na 65 °C.

Tablica 8. Eksperimentalno korištene restriksijske endonukleaze.

Enzim	Mjesta cijepanja
<i>BamHI</i>	5' G/GATCC 3' 3' CCTAG/G 5'
<i>EcoRI</i>	5' G/AATTC 3' 3' CTAA/G 5'
<i>EcoRV</i>	5' GAT/ATC 3' 3' CTA/TAG 5'
<i>HindIII</i>	5' A/AGCTT 3' 3' TTCGA/A 5'
<i>NcoI</i>	5' C/CATGG 3' 3' GGTAC/C 5'
<i>NdeI</i>	5' C/CATGG 3' 3' GGTAC/C 5'
<i>NotI</i>	5' GC/GGCCGC 3' 3' CGCCGG/CG 5'
<i>XhoI</i>	5' C/TCGAG 3' 3' GAGCT/C 5'

3.2.9. Ligacija

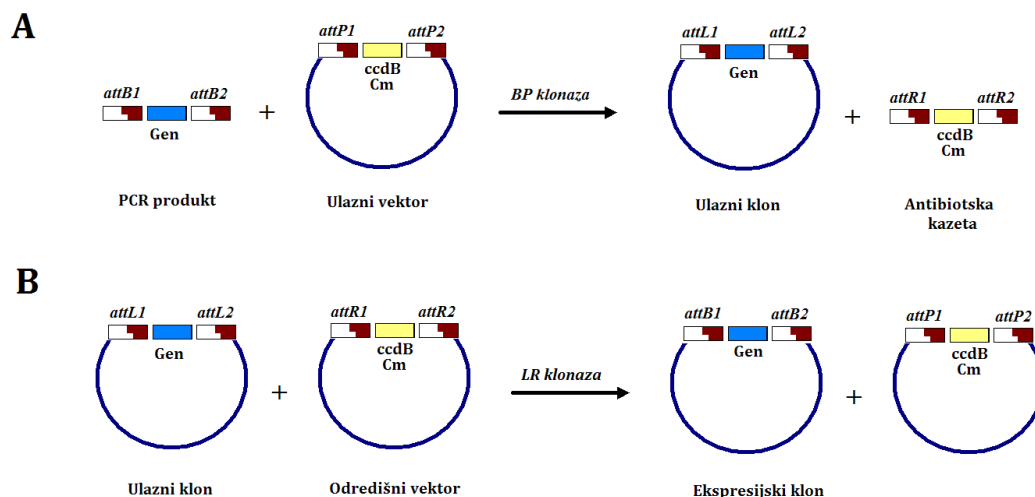
Reakcija ligaze podrazumijeva uspostavljanje fosfodieterske veze između hidroksilne skupine 3'-kraja jednog nukleotida i fosfatne skupine na 5'-kraju drugog nukleotida. Reakciju katalizira enzim DNA-ligaza u tri koraka: u prvom koraku lizin u aktivnom mjestu enzima na sebe veže ATP uz otpuštanje pirofosfata, slijedi prijenos nastalog AMP-a na fosfatni ostatak 5'-kraja nukleotida jednog nukleotidnog lanca uz nastajanje pirofosfatne veze, te konačno u trećem koraku hidroksilna skupina 3'-kraja drugog nukleotidnog lanca formira fosfodietersku vezu s aktiviranim fosfatnim ostatkom prvog nukleotidnog lanca pri čemu se otpušta AMP. U živoj stanici ligacija služi povezivanju nukleotida prekinutog polinukleotidnog lanca u procesu DNA replikacije ili popravka uslijed oštećenja, dok se u laboratorijskom kloniranju koristi za povezivanje pocijepanih PCR produkata s odgovarajuće pocijepanim vektorima radi ubacivanja željenog DNA fragmenta u vektor. U ovom radu korištena je T4-DNA-polimeraza (*Thermo*) u konačnoj koncentraciji od 0,25 U µL⁻¹ (1 U definira se kao količina enzima

potrebna za ligaciju 50 % fragmenata DNA faga λ pocijepanih s *HindIII* u 30 minuta na 16 °C) u odgovarajućem komercijalnom puferu (sastav 10 × koncentriranog pufera: 400 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 7.8, 100 mmol dm⁻³ MgCl₂, 100 mmol dm⁻³ DTT, 5 mmol dm⁻³ ATP). Omjer množine vektora naspram množine PCR produkta bio je između 1:3 i 1:5, dok je masa vektora bila 100 ng. Reakcijske smjese inkubirane su 2 sata na 22 °C i potom zaustavljene inkubacijom 10 minuta na 65 °C. Za elektroporaciju je korišteno od 1-5 µl reakcijske smjese.

3.2.10. Gateway kloniranje

Tehnologija tzv. *gateway* kloniranja temelji se na rekombinaciji, odnosno zamjeni dijela vektora -kazete omeđene specifičnim *att* regijama željenim genskim fragmentom kojemu su prethodno PCR reakcijom također dodane takve regije. Proces je podijeljen u dva koraka (slika 9.): prvo se djelovanjem enzima BP klonaze vektorska kazeta s regijama attP zamjenjuje s PCR produktom omeđenim regijama attB, pri čemu nastaje ulazni klon s attL regijama. S obzirom da ulazni vektor u kazeti omeđenoj attP regijama sadrži gen koji kodira CcdB protein-inhibitor giraze, te gen za rezistenciju na kloramfenikol, u slučaju neuspješne rekombinacije bakterije transformirane ovim plazmidom neće se moći dijeliti, odnosno rasti će na podlogama s kloramfenikolom. Ulazni vektor također posjeduje još i neki drugi gen za rezistenciju na antibiotike, što dodatno olakšava potvrdu uspješnosti kloniranja. U drugom koraku *gateway* kloniranja, enzim LR klonaza zamjenjuje genski fragment omeđen regijama attL ulaznog klona s kazetom odredišnog vektora omeđenom attR regijama pri čemu nastaje ekspresijski klon s attB regijama. Osnovna prednost ovakvog kloniranja nad kloniranjem upotrebom restrikcijskih endonukleaza i ligaze, jest u mogućnosti konstruiranja različitih vrsta ekspresijskih klonova upotrebom samo jedne vrste ulaznog klona i rekombinaze.⁹⁸ U ovom radu reakcija enzima BP klonaze pripremljenja je miješanjem 100 ng vektora *pDONR207* (*Life Technologies*), 100 ng DNA i 1 µl komercijalne enzimske smjese *Gateway BP Clonase II* (*Life Technologies*) do ukupnog volumena reakcije od 10 µl. Reakcijska smjesa je inkubirana 6 sati na 25 °C, nakon čega joj je dodano 0,5 µL otopine proteinaze K (2 g dm⁻³) (*Life Technologies*), te dodatno inkubirano 10 minuta na 37 °C radi terminacije djelovanja BP klonaze. Stanice *E. coli* transformirane su s 1 µL reakcijske smjese i nasađene na hranjivu podlogu LB s dodanim gentamicinom. Dobivene bakterijske kolonije dodatno su nasađene na

hranjivu podlogu s dodanim kloramfenikolom kako bi se odbacili lažni pozitivni koji nisu izbacili antibiotsku kazetu.



Slika 9. Shematski prikaz tzv. gateway kloniranja: A- prvi korak podrazumijeva rekombiniranje PCR produkta s *attB1* i *B2* regijama u ulazni vektor koji sadrži *attP1* i *P2* regije enzimskim djelovanjem enzimske smjese BP klonaze pri čemu nastaje tzv. ulazni klon s *attL1* i *L2* regijama. B- u drugom koraku gen od interesa moguće je rekombinirati u bilo koji odredišni vektor koji sadrži *attR1* i *attR2* pri čemu nastaje ekspresijski klon s *attB1* i *B2* regijama.

Reakcija enzima LR klonaze pripremljena je miješanjem 100 ng ulaznog klona i 100 ng odgovarajućeg odredišnog vektora (pB7FWG2.0; pB7WGF2.0, *Plant System Biology, Universiteit Gent*), te dodavanjem 1 μL komercijalne enzimske smjese *Gateway LR Clonase II* (*Life Technologies*). Reakcijska smjesa inkubirana je 6 sati na 25 °C, nakon čega joj je dodano 0,5 μL otopine proteinaze K (2 g dm^{-3}) (*Life Technologies*), te dodatno inkubirano 10 minuta na 37 °C radi terminacije djelovanja BP klonaze. Stanice *E. coli* transformirane su s 1 μL reakcijske smjese i nasađene na hranjivu podlogu LB s dodanim streptomycinom.

3.2.11. Sekvenciranje nukleotidnih sljedova

Provjera ispravnosti kloniranja gena od interesa u odgovarajuće vektore, te analiza DNA potencijalnih pozitiva dobivenih metodom kvašćevih dvaju hibrida (eng. *Yeast two-hybrid, Y2H*) provedena je sekvenciranjem DNA u DNA-servisu Instituta Ruđer Bošković, odnosno DNA-servisu *Macrogen Inc.* Sekvenciranje je provedeno s početnicama upotrijebljenim za kloniranje ili u slučaju vektora pET28b s univerzalnim T7-početnicama (T7Primer: 5'

TAATACGACTCACTATAG GG 3', T7Terminator: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'). DNA potencijalnih pozitiva dobivenih metodom Y2H sekvencirane su korištenjem početnice GADR (5' CATAAAAGAAGGCAAAACGATG 3'). Analiza sekvenci napravljena je pomoću programa BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*), sravnjivanje sekvenci u programu *ClustalX*, analiza slijeda aminokiselina u programu *ExPASy Translate*, dok su kromatogrami analizirani u programu *Chromas Lite*.

3.2.12. DNazni tretman

DNaza I cijepa jednolančane i dvolančane molekule DNA prekidajući fosfodiestersku vezu u susjedstvu primidinskih baza formirajući nukleotide sa slobodnom hidroksilnom skupinom na 3'-kraju. Korištena je u ovom radu u svrhu pročišćavanja izolata mRNA od genomske DNA prije reakcije reverzne transkriptaze. Reakcijska smjesa sadržavala je 20 µg mRNA onečišćene genomskom DNA, 20 µl 10 × koncentriranog pufera (400 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 8.0, 100 mmol dm⁻³ MgSO₄, 10 mmol dm⁻³ CaCl₂), 6 µL Dnaze I (1 U µL⁻¹; 1 U definiran je kao količina DNaze I potrebne za potpuno cijepanje 1 µg DNA faga λ u 10 minuta na 37 °C u reakcijskom volumenu od 50 µl) i 1 µL inhibitora RNaze A (40 U µL⁻¹; 1 U definiran je kao količina inhibitora potrebna za 50 % inhibiciju aktivnosti 5 ng RNaze A; *RNasin* (Promega), *RNase out* (Life Technologies)) u ukupnom reakcijskom volumenu od 200 µL. Smjesa je inkubirana 30 minuta na 37 °C, nakon čega je dodano 20 µL stop otopine (20 mmol dm⁻³ EGTA pH = 8.0) i inkubirano 10 minuta na 65 °C. Precipitacija mRNA postignuta je dodatkom 22 µL 1 mol dm⁻³ natrijevog acetata, 550 µL 100 % (v/v) etanola i držanjem preko noći na - 20 °C, te centrifugiranjem 30 minuta na 10 000 × g. Talog mRNA resuspendiran je u 25 µL vode tretirane DEPC-om, te je spektrometrijski određena koncentracija.

3.2.13. Reakcija reverzne transkriptaze

Reverzna transkriptaza je enzim koji katalizira reakciju nastajanja komplementarne DNA (cDNA) iz ribonukleinskog kalupa u procesu znanom kao reverzna transkripcija. U ovom radu reakcija reverzne transkriptaze postavljena je tako da je 1 µg mRNA pomiješan sa smjesom početnica oligo dT i nasumičnih heksamera (eng. *random hexamers*) (konačna koncentracija svake 5 µmol dm⁻³), smjesom dNTP-ova (konačna koncentracija svakog 0,5

mmol dm⁻³) do konačnog reakcijskog volumena od 57 µL. Otopina je zagrijavana 5 minuta na 65 °C kako bi došlo do denaturacije RNA, te potom ohlađena 5 minuta na ledu prije dodavanja 12 µL pufera za reverznu transkriptazu (sastav 5 × koncentriranog pufera: 250 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 8.3, 375 mmol dm⁻³ KCl, 15 mmol dm⁻³ MgCl₂), 3 µL DTT (100 mmol dm⁻³) i 1 µL inhibitora RNaze A (40 U µL⁻¹). Potom je reakcijska smjesa razdijeljena na dva dijela- prvi volumen 42,75 µL u koji je dodano 2,25 µL reverzne transkriptaze *Superscript III Reverse Transcriptase* (200 U µL⁻¹; 1 U definiran je kao količina enzima potrebna za ugradnju 1 nmol dNTP-ova u precipitat pri kiselim uvjetima u 10 minuta pri 37 °C korištenjem poli(A)· oligo(dT)₁₂₋₁₈ kombinacije kalup· početnica; *Life Technologies*), te drugi volumena 14,25 µL u koji je dodano 0,75 µL vode i koji je služio kao kontrola zagađenja molekulama DNA. Oba uzorka inkubirana su pod istim uvjetima: 25 °C kroz 5 minuta, zatim 50 °C 1 sat i završno 70 °C 15 minuta.

3.3. Metode rada s proteinima

Pri radu s proteinima poštovane su upute iz laboratorijskog priručnika J. Sambrook i D. Russell: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001), odnosno upute proizvođača priložene kemikalijama i kompletima.

3.3.1. SDS-poliakrilamidna elektroforeza

Proteini su analizirani elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS). SDS je negativno nabijeni deterdžent koji vezanjem na hidrofobne dijelove proteina dovodi do odmatanja proteina i razdvajanja oligomernih proteina na pojedinačne polipeptidne lance, te čini da je ukupni naboj proteina negativan. Vezanje SDS-a na protein je ravnomjerno, što dovodi do istog omjera naboja i mase kod svih proteina u uzorku, te se oni razdvajaju isključivo na temelju svoje molekulske mase. U ovom istraživanju korišten je *PROTEAN TETRA* (*Bio-Rad*) komercijalni komplet za pripremu poliakrilamidnih gelova i provođenje elektroforeze. Korišteni su diskontinuirani gelovi, pri čemu je donji gel bio za razdvajanje (9 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1 w/v), 0,375 mol dm⁻³ Tris-HCl pH = 8.8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,7 µg mL⁻¹ APS, 0,05 % (w/v) TEMED), a gornji za sabijanje proteina (4 % (w/v) akrilamid-bisakrilamid (29:1 w/v), 0,125 mol dm⁻³ Tris-HCl pH = 6.8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,7 µg mL⁻¹ APS, 0,05 % (w/v) TEMED). Smjesa za gel za

razdvajanje je po izlivanju u kalup nadsvođena destiliranom vodom kako bi se spriječio kontakt s kisikom koji inhibira polimerizaciju, a također i radi izbjegavanja formiranja meniskusa na gornjem rubu gela prilikom polimerizacije. Nakon 30 minuta, voda je uklonjena i izlivena je smjesa za gel za sabijanje u koji je umetnut češljic za formiranje jažica definiranih dimenzija. Proteini su za analizu pripremljeni miješanjem s puferom za nanošenje ($62,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ Tris-HCl pH = 6.8, $12,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ β -merkaptoetanol, 6,25 % (v/v) glicerol, 1,25 % (w/v) SDS, 0,002 % (w/v) bromfenolno plavilo) i zagrijavanje 5 minuta na 100°C radi pospješivanja denaturacije. Kao marker veličine korišten je *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). Elektroforetski pufer (pH = 8.3) bio je sastava: $14,4 \text{ g dm}^{-3}$ glicin, 0,1 % (w/v) SDS i $3,03 \text{ g dm}^{-3}$ Tris-HCl. Elektroforeza je provedena pri sobnoj temperaturi 15 minuta na 120 V (radi sabijanja uzoraka) i potom 45 minuta na 180 V. Vizualizacija proteina postignuta je bojanjem gela otopinom boje *Coomassie Brilliant Blue R-250* ($2,5 \text{ g dm}^{-3}$, 10 % (v/v) octena kiselina, 45 % (v/v) etanol) 15 minuta, te uklanjanjem viška boje odbojavanjem u vrućoj vodi. Drugi način bilo je bojanje sa srebrom. Gel je držan 30 minuta u otopini sastava: 48 % (v/v) etanol, 12 % (v/v) octena kiselina, nakon čega je prebačen u otopinu sastava: 10 % (v/v) etanol, 5 % (v/v) octena kiselina i inkubiran narednih 30 minuta. Potom je izvršena senzitacija potapanjem gela 5 minuta u otopinu kalijevog bikromata (1 g dm^{-3}), nakon čega je gel ispran i potpoljen u otopinu srebra (2 g dm^{-3} , 0,02 % (v/v) HNO_3) 30 minuta. Razvijanje se odvijalo u tri koraka: prvo je gel potopljen 2 minute u otopinu predrazvijача (50 g dm^{-3} Na_2CO_3 , 0,004 % (w/v) formaldehid), nakon odsisavanja dodana je otopina razvijача (50 g dm^{-3} Na_2CO_3 , 0,002 % (w/v) formaldehid), te je nakon pojave vidljivih proteinskih pruga na gelu razvijanje zaustavljeno odsisavanjem i dodavanjem otopine za zaustavljanje (0,01 % (v/v) octena kiselina).

3.3.2. Nadekspresija proteina od interesa

Radi postizanja nadekspresije proteina od interesa bakterije *E. coli* soja BL21 (DE3) transformirane su odgovarajućim ekspresijskim vektorom (pET28b, pGEX-6P-1, pGEX-6P-2, pPROEX Htb). Korišteni vektori sadrže T7 (pET28b) ili neki drugi IPTG-om inducibilni promotor (*trc*, *tac*) uzvodno od gena od interesa, te se na ovaj način može postići nadekspresija proteina za koje kodira gen od interesa. Ovdje će ukratko biti opisan temeljni princip T7 ekspresijskog sustava kojeg čine odgovarajući ekspresijski pET plazmidi i ekspresijski soj bakterija *E. coli*. U genomu ovih bakterija integriran je gen za T7-RNA-

polimerazu iz bakteriofaga T7, učestalo korištenu u molekularnoj biologiji i biokemiji zbog mogućnosti da transkribira gotovo svaki slijed DNA povezan s T7 promotorom. Gen za T7-RNA-polimerazu je pod kontrolom *lacUV5* promotora kojeg aktivira izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), vežući se na *lac* represor što dovodi do transkripcije T7-RNA-polimeraze, te posljedično i transkripcije sljedova pod kontrolom T7 promotora. Iza T7 promotora u pET vektorima se nalazi *lac* operator tzv. *T7lac* promotor, te se i on induicira IPTG-om.⁹⁹

Nadekspresija proteina od interesa u ovom radu postignuta je inokulacijom odgovarajuće količine tekućeg hranjivog medija LB (s dodanim antibioticima) bakterijama transformiranim odgovarajućim plazmidima, te je sve inkubirano na 30 °C preko noći uz protresanje brzinom od 200 okretaja po minuti. Idući dan zasićena prekonoćna kultura razrijeđena je svježim LB medijom (s dodanim antibiotikom) 10 \times u slučaju daljnjeg uzgoja na 15 °C, odnosno 100 \times u slučaju daljnjeg uzgoja na 30 °C, te protresanje istom brzinom. Rast bakterija praćen je spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće, te kada je kultura dostigla vrijednost $OD_{600} = 0,6-0,8$, dodan je IPTG do konačne koncentracije od 0,5 mmol dm⁻³, te je nastavljeno s inkubacijom. Nakon 4 sata za kulture uzgajane na 30 °C, odnosno 12 sati za kulture uzgajane na 15 °C stanice su oborene centrifugiranjem na 4 000 \times g 15 minuta na 4 °C. U eksperimentima probne ekspresije korišteno je više bakterijskih kolonija za isti konstrukt, te su ispitivane različite temperature inkubacije pri indukciji, radi određivanja optimalne ekspresije.

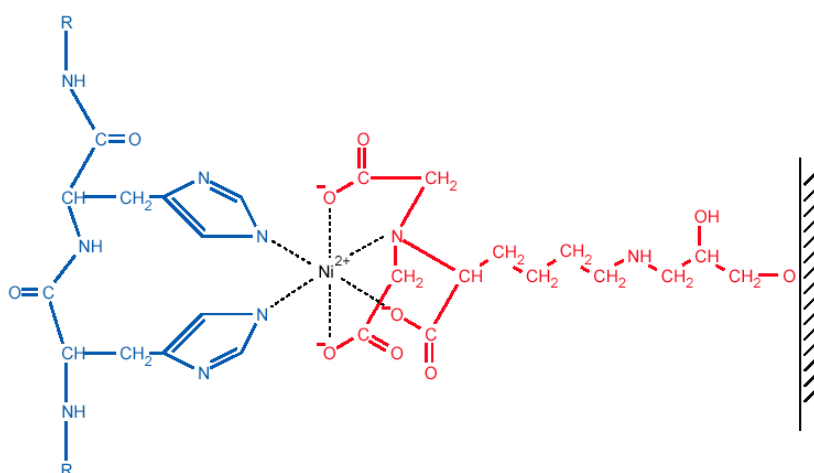
3.3.3. Homogeniziranje stanica

Talog stanica nakon indukcije resuspendiran je u lizacijskom puferu (25 mmol dm⁻³ Tris-HCl, 500 mmol dm⁻³ NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ DTT, 1 mmol dm⁻³ PMSF (inhibitor serinskih proteaza), 50 ng μ l⁻¹ lizozim, 3 ng μ l⁻¹ DNaza I) i soniciran na ledu korištenjem sonikatora *High Intensity Ultrasonic Processor (Bioblock Scientific)* u 6 ciklusa po 1 minutu uz 1 minutu pauze između ciklusa ili korištenjem razbijača stanica *Cell disruptor (Constant Systems)* pri tlaku od 190 MPa. Homogenizat stanica centrifugiran je 1 sat na 10 000 \times g na 4 °C, nakon čega je supernatant (frakcija topljivih proteina) profilitriran kroz sterilni celuloza acetatni filter veličine pora 0,22 μ m.

3.3.4. Kromatografsko pročišćavanje proteina

3.3.4.1. Afinitetna kromatografija

Ovdje korištena afinitetna kromatografija na Ni-NTA agarozu učestala je metoda za relativno jednostavno, brzo i efikasno pročišćavanje proteina s heksahistidinskim privjescima (His)₆. Dušikovi atomi imidazolnog prstena histidina u privjesku proteina interagiraju s niklovim ionima (Ni²⁺) keliranim nitrilacetnom kiselinom (NTA) vezanom za agarozni matriks stacionarne faze. NTA kao tetradentatni kelirajući agens zaokuplja 4-6 koordinacijskih mjesta niklovog iona, dok se zadnja dva slobodna mjesta koriste za interakciju s histidinom (slika 10.). Po jednom mililitru Ni-NTA smole moguće je vezati 5-10 mg proteina s (His)₆-privjeskom. Imidazol se u malim koncentracijama dodaje u reakcijske puferne radi smanjivanja nespecifičnog vezanja na smolu proteina s intrinzično raspršenim histidinima, odnosno u visokoj koncentraciji u elucijskom puferu radi kompetitivnog istiskivanja proteina s vezanih mjesta atoma nikla.¹⁰⁹



Slika 10. Shematski prikaz principa afinitetne kromatografije korištenjem Ni-NTA agaroze. Na agarozni matriks-stacionarnu fazu vezana je nitrilacetna kiselina koja kelira niklove ione koji dalje uspostavljaju koordinacijske veze s histidinskim ostacima u proteinima mobilne faze (preuzeto iz¹⁰⁹).

U ovom radu afinitetna kromatografija provedena je na 4 °C radi očuvanja stabilnosti proteina. Otopina frakcije topljivih proteina dobivena nakon homogenizacije stanica (opisano u poglavlju 3.3.3.) pomiješana je sa 1 mL Ni-NTA smole, prethodno isprane u vodi i uravnotežene u puferu A (25 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 7,4 (mjereno na sobnoj temperaturi), 500 mmol dm⁻³ NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm⁻³ DTT, 10 mmol dm⁻³ imidazol), te inkubirana 1 sat uz miješanje okretanjem kako bi se povećala efikasnost vezanja proteina na

smolu. Potom je smjesa propuštena kroz praznu kolonu na kojoj se zadržavala smola s vezanim proteinima, dok je ostatak propušten. Ispiranje je napravljeno dodatkom novih 20 mL pufera A, te 30 mL pufera B (sastav identičan puferu A, osim što je koncentracija imidazola povećana $2 \times$). Elucija je napravljena dodavanjem 12 mL pufera C (sastav identičan puferu A, osim koncentracije imidazola koja je iznosila 400 mmol dm^{-3}). Smola je nakon elucije isprana s 2 mL otopine imidazola (2 mol dm^{-3}), zatim 30 mL ReH_2O , te je konačno spremljena na 4°C u otopini 20 % (v/v) etanola. Frakcije nakon elucije analizirane su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom.

Za pročišćavanje proteina s GST-privjeskom korištena je GST-agaroz. Na agarozni matriks vezan je glutation na koji se prilikom prolaska proteina kroz kolonu selektivno veže GST-privjesak fuzijskog proteina od interesa. Elucija proteina s kromatografske kolone se vrši propuštanjem otopine reduciranog glutationa koji kompetitivno uklanja GST-fuzijski protein s kolone. U ovom radu GST afinitetna kromatografija provedena je na 4°C na način da je frakcija topljivih proteina dobivenih nakon homogenizacije stanica pomiješana s 1 mL GST agaroze (ukupni vezni kapacitet je $> 5 \text{ mg GST-proteina po } 1 \text{ mL GST-agaroze}$) koja je prethodno uravnotežena u PBS puferu ($140 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $2,7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ KCl}$, $10 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$, $1,8 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH} = 7,5$) te je zatim smjesa inkubirana uz miješanje od 50 okretaja po minuti kroz sat vremena. Nakon završetka inkubacije, smjesa je propuštena kroz praznu kolonu kako bi se postiglo ukoncentriravanje punila, te je provedeno ispiranje s 10 mL PBS pufera. Elucija je napravljena s 5 mL svježe pripremljene otopine sastava: 10 mmol dm^{-3} reducirani glutation, $50 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Tris-HCl}$ ($\text{pH} = 8,0$ pri 4°C).

3.3.4.2. Ionsko-izmjenjivačka kromatografija

Zahvaljujući promjeni naboja slobodnih funkcionalnih skupina aminokiselina u proteinima pri različitim pH vrijednostima otopina u kojima se proteini nalaze, mijenja se i ukupan neto naboj proteina. Punilo stacionarne faze u ionsko-izmjenjivačkoj kromatografiji posjeduje ukupno pozitivan (kolone za izmjenu aniona) ili negativan (kolone za izmjenu kationa) naboj, te se proteini iz smjese izdvajaju zahvaljujući ionskoj interakciji sa stacionarnom fazom zbog razlike u predznacima naboja. U ovom radu ionsko-izmjenjivačka kromatografija korištena je ili kao primarna metoda pročišćavanja proteina bez privjeska ili za dodatno pročišćavanje proteina nakon afinitetne kromatografije. Korištene su dvije vrste kolona s polistirenskim

matriksom uz dodatak divinil benzena: *MonoQ 10/10* (GE Healthcare) za pročišćavanje proteina negativnog neto naboja, odnosno *MonoS 10/10* (GE Healthcare) za pročišćavanje proteina pozitivnog neto naboja. Proteini su prije nanošenja na kolonu *MonoQ* uravnoteženi ultrafiltracijom u puferu A niske ionske jakosti (25 mmol dm^{-3} Tris-HCl (mjereno pri sobnoj temperaturi) pH 7,4, 50 mmol dm^{-3} KCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm^{-3} DTT), a u istom puferu je uravnotežena i sama kolona. Elucija je postignuta korištenjem smjese pufera A i B (sastav pufera B je isti sastavu pufera A, osim što je koncentracija KCl iznosila 800 mmol dm^{-3}) na način da se u vremenu postepeno povećavao volumni udio pufera B u smjesi, a time i ionska jakost. Pri određenoj vrijednosti ionske jakosti došlo je do elucije proteina od interesa. Pri korištenju kolone *MonoS*, proteini i kolona uravnoteženi su u puferu A (50 mmol dm^{-3} MES pH = 6,0, 50 mmol dm^{-3} KCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm^{-3} DTT). Pufer B (50 mmol dm^{-3} MES pH = 6,0, 800 mmol dm^{-3} KCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm^{-3} DTT) korišten je za eluciju na jednak način kao i u slučaju kromatografije na koloni *MonoQ*. Frakcije nakon elucije analizirane su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom.

3.3.4.3. Gel-filtracija

Upotrebom gel-filtracije moguće je razdvojiti proteine s obzirom na razlike u njihovoj veličini, odnosno masi. Stacionarnu fazu čini punilo čije čestice sadrže pore u kojima se proteini manji od promjera pora zadržavaju, dok veći prolaze i prije eluiraju s kolone. Uz upotrebu markera mase, a i s obzirom da se proteini nalaze u nativnim konformacijama, ova metoda pogodna je za pročišćavanje proteina, ali i određivanje njegove relativne molekulske mase. U ovom radu korištene su gel-filtracijske kolone *Superdex75 10/300* (za razdvajanje proteina raspona M_r od 3000 do 70000) i *Superdex200 10/300* (za razdvajanje proteina raspona M_r od 10 000 do 600 000) (GE Healthcare) punjene komercijalnom smjesom agaroze i dekstrana. Korišteni pufer bio je sastava: 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH = 7,5, mjereno pri sobnoj temperaturi, 50 mmol dm^{-3} NaCl, 5 % (w/v) glicerol, 1 mmol dm^{-3} DTT. Frakcije nakon elucije analizirane su SDS-poliakrilamidnom elektroforezom.

3.3.5. Ultrafiltracija

U slučajevima kada je bilo potrebno zamijeniti pufer u kojemu se proteini nalaze prije kromatografije ili ugustiti elucijske frakcije nakon kromatografije korištena je ultrafiltracija

kroz anizotropnu membranu. Rabljeni su *Amicon Ultra centrifugal filters (Milipore)* s veličinom pora kroz koje prolaze samo čestice manje od 30 kDa, odnosno za pročišćavanje proteina GST, PNF i L9-1 membrane s veličinom pora kroz koje prolaze samo čestice manje od 10 kDa. Otopina proteina stavljena je u filterski sustav i centrifugirana na $5\,000 \times g$ na 4 °C, pri čemu su molekule manje od promjera pora membrane prošle kroz membranu pod utjecajem centrifugalne sile, te je došlo do smanjenja volumena otopine proteina koji nisu mogli proći kroz pore, odnosno do povećanja koncentracije proteina od interesa.

3.3.6. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je metodom po Bradfordu, te spektrofotometrijski na 280 nm. U prvom slučaju pripremljena je serija otopina BSA za određivanje baždarnog dijagrama koje su sadržavale redom: 3, 5, 8, 12, 15 i 18 µg BSA u otopini Bradfordovog reagensa (50 mg dm⁻³ Coomassie Blue G-250, 5 % (v/v) metanol, 8,5 % (v/v) H₃PO₄). Istovremeno su pripremljene i otopine proteina od interesa tako da je na 1 mL otopine Bradfordovog reagensa dodano 1 µL nerazrijeđene, odnosno 1 µL 10 × razrijeđene otopine proteina od interesa. Sve otopine su inkubirane na sobnoj temperaturi 45 minuta i potom im je izmjerena apsorbancija na 595 nm, konstruiran baždarni dijagram, te linearnom regresijom određena koncentracija. Ova metoda temelji se na pomaku apsorpcijskog maksimuma boje Coomassie Brilliant Blue G-250 s valne duljine od 465 nm na 595 nm u kiselom mediju pri reakciji boje s prvenstveno argininskim ostacima proteina, te u manjoj mjeri histidinom, lizinom, triptofanom, tirozinom i fenilalaninom pri čemu dolazi do ionskih, odnosno hidrofobnih interakcija. Promjena boje iz smeđe u plavu praćena je spektrofotometrijski.

Drugi način određivanja koncentracije proteina u otopini bio je mjerenjem apsorbancije na 280 nm pri čemu najviše apsorbiraju aromatske aminokiseline. Uz poznavanje molarnog ekstincijskog koeficijenta (koji je za svaki protein određen u programu *ExPASy*), te primjenom Lambert-Beerovog zakona izračunata je molarna koncentracija proteina.

3.3.7. Regeneracija proteina iz inkluzijskih tijela

Protein NSerRS pokazivao je nakon nadekspresije u bakterijama tendenciju taloženja u tzv. inkluzijska tijela vjerojatno kao posljedicu nepravilnog smatanja proteina u trodimenzijsku

strukturu. Korištenjem jakog denaturacijskog agensa gvanidin hidroklorida (GuHCl) nepravilno smotani protein je denaturiran i zatim nakon polaganog postepenog uklanjanja GuHCl dijalizom dobiven u topljivoj formi. Prvi korak regeneracije napravljen je resuspendiranjem taloga opetovano kroz 18g injekcijsku iglu u puferu sastava: 50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 8,0, 6 mol dm⁻³ GuHCl, 10 mmol dm⁻³ DTT. Sve što je ostalo neotopljeno uklonjeno je centrifugiranjem na 12 000 × g na 4 °C kroz 20 minuta, dok je otopina proteina razrijeđena 2 × dodatkom dijalizacijskog pufera 1 (50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 8,0, 2 mol dm⁻³ GuHCl), stavljena u crijevo celulozne membrane za dijalizu (*Sigma*) koje je zatvoreno i potom uronjeno u 2 litre pufera 1 i dijalizirano preko noći. Idući dan crijevo je prenešeno u 2 L novog dijalizacijskog pufera 2 (50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 8,0, 1 mol dm⁻³ GuHCl, 0,4 mol dm⁻³ arginin, 3 mmol dm⁻³ reducirani galutation) i dijalizirano preko noći. Treći dan postojeći dijalizacijski pufer 2 razrijeđen je 2 × dodatkom ReH₂O, te je dijaliza nastavljena preko noći. Četvrti dan crijevo je otvoreno i sav istaloženi materijal uklonjen je centrifugiranjem pod istim uvjetima kao i prvi put, dok je topljiva frakcija proteina stavljena u novo crijevo i dijalizirana preko noći u 1 L dijalizacijskog pufera 3 (50 mmol dm⁻³ pH = 8,0, 250 mmol dm⁻³ NaCl, 0,1 mmol dm⁻³ arginin, 3 mmol dm⁻³ reducirani glutation). Završni dan crijevo je otvoreno i otopina proteina je centrifugirana pod istim uvjetima kao i ranije kako bi se razbistrila od eventualnog taloga. Dobivena proteinska topljiva frakcija dalje je podvrgnuta Ni-NTA afinitetnoj kromatografiji, nakon čega je uspješnost regeneracije iz inkluzijskih tijela i pročišćavanje NSerRS proteina s (His)₆ privjeskom provjereno na SDS-poliakrilamidnoj elektroforezi.

3.3.8. Kinetičke analize

3.3.8.1. Određivanje aminoacilacijske aktivnosti SerRS

Za određivanje aminoacilacijske aktivnosti SerRS-His i SerRS pripremljena je smjesa u koju je dodano 8 µl tzv. *charging* pufera (0,3 mol dm⁻³ Tris-HCl pH = 7,5, 75 mmol dm⁻³ MgCl₂, 2 g dm⁻³ BSA, 25 mmol dm⁻³ ATP, 20 mmol dm⁻³ DTT), 10 µl smjese serina (0,16 mmol dm⁻³ [¹²C]Ser, 0,34 mmol dm⁻³ [¹⁴C]Ser) i komercijalno dostupna ukupna tRNA iz kvasca *S. cerevisiae* i bakterije *E. coli* (*Roche*) željene koncentracije. Reakcija je započeta dodatkom enzima tako da mu je konačna koncentracija iznosila 5 nmol dm⁻³ (do željene koncentracije razrijeđen je u puferu sastava: 10 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 7,5, 10 mmol dm⁻³ KCl, 0,4 g

dm⁻³ BSA), a ukupan volumen reakcijske smjese 40 µl. Reakcija je provođena na 30 °C, te je u zadanim vremenskim intervalima uzimano po 9 µl alikvota koji su zatim stavljani na komadiće filter papira (*Whatman 3MM*) i uranjeni u hladnu 10 % (w/v) trikloroctenu kiselinu (TCA) koja služi zaustavljanju aminoacilacije taloženjem makromolekula, nakon čega su u istoj kiselini i isprani 10 minuta uz miješanje kako bi se uklonio višak radioaktivne aminokiseline s filter papira. Dodatno ispiranje provedeno je 2 × po 5 minuta u otopini 5 % (w/v) TCA, te jednom u 96 % (v/v) etanolu, nakon čega su filteri osušeni i uronjeni u scintilacijsku otopinu (5 g dm⁻³ 2,5-difenil oksazol (PPO), 0,3 g dm⁻³ 1,4-bis(2-(4-metil-5-fenil)oksazolil)benzen (POPOP), toluen). S obzirom da je korištena radioaktivno obilježena aminokiselina [¹⁴C]Ser, nastali produkt aminoacilacije sadržavao je radioaktivno obilježeni kompleks [¹⁴C]Ser-tRNA^{Ser}, te je količina radioaktiviteta proporcionalna količini nastalog kompleksa određenog u scintilacijskom brojaču za svaki alikvot vremenskog tijeka. Za određivanje koncentracije kompleksa konstruiran je baždarni dijagram s poznatim količinama radioaktiviteta, te je koncentracija određena matematički. Iz grafičkog prikaza ovisnosti promjene koncentracije produkta u vremenu, linearnom regresijom izračunata je brzina aminoaciliranja, odnosno aktivnost enzima.

3.3.8.2. Određivanje kinetičkih parametara K_M i k_{cat}

Određene su kinetički parametri K_M i k_{cat} za enzim SerRS-His korištenjem ukupne tRNA iz kvasca *S. cerevisiae*. Reakcije aminoaciliranja provođene su na način opisan u poglavlju 3.3.8.1. uz variranje koncentracije ukupne tRNA u reakcijskoj smjesi ($1,25 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ do 8×10^{-8} mol dm⁻³) i koncentraciju enzima od 2,5 nmol dm⁻³, te su linearnom regresijom određene brzine aminoaciliranja za različita razrijeđenja tRNA. Iz grafičkog prikaza ovisnosti početne brzine reakcije (brzine aminoaciliranja) o koncentraciji tRNA nelinearnom regresijom (Michaelis-Menten model) određeni su kinetički parametri.

3.3.9. Western-hibridizacijska analiza

Proteine od interesa moguće je detektirati korištenjem specifičnih antitijela koja se vežu ili za sam protein ili za privjesak koji nosi. *Western-hibridizacijska* analiza odvija se u nekoliko koraka: prijenos proteina s poliakriamidnog gela na nitroceluloznu membranu, blokiranje

membrane inertnim proteinima kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela na membranu, specifično vezanje primarnih antitijela na protein od interesa, vezanje sekundarnih antitijela na primarna antitijela, detekcija signala sekundarnih antitijela. U ovom radu nakon završene SDS-poliakriamidne elektroforeze odstranjen je gel za sabijanje, gelu za razdvajanje su izmjerene dimenzije kako bi mu se mogla izračunati površina, te je inkubiran 15 minuta u puferu za prijenos ($14,4 \text{ g dm}^{-3}$ glicin, 3 g dm^{-3} Tris-HCl pH = 7,5, 20 % (v/v) etanol). Potom je u instrumentu za polusuhi prijenos *2117 Multiphor II (LKB)* između dvije pločaste grafitne elektrode postavljena *sendvič konstrukcija* koja se sastojala od vršnog sloja filter papira (3 komada) izrezanih tako da odgovaraju dimenzijama gela, te namočenih u puferu za prijenos. Na sloj filter papira položen je poliakrilamidni gel, a na njega nitrocelulozna membrana (*Amersham*) odgovarajuće veličine namočena u puferu za prijenos, koja je konačno pokrivena gornjim slojem filter papira pripremljenim na isti način kao i prethodni. Gustoća električnog polja podešena je na vrijednost od $0,8 \text{ mA cm}^{-2}$, orijentacija komponenti *sendvič* konstrukcije postavljena je tako da gel bude okrenut prema katodi, a membrana prema anodi kako bi uslijed djelovanja električnog polja negativno nabijeni proteini iz gela krenuli prema pozitivno nabijenoj anodi, odnosno membrani. Prijenos je trajao 1,5 sati na sobnoj temperaturi, nakon čega je uspješnost provjerena potapanjem membrane u otopini *Ponceau S* (0,1 % (w/v), 5 % (v/v) octena kiselina) (*Sigma*). Višak boje uklonjen je ispiranjem u vodi, a membrana je potopljena u pufer za blokiranje (5 % nemasno mlijeko (w/v), 25 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH = 7,5, 150 mmol dm^{-3} NaCl, 0,2 % (v/v) *Tween*) preko noći na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kako bi se dijelovi membrane bez proteina zasitili kazeinom iz mlijeka, te na taj način spriječilo kasnije nespecifično vezanje antitijela na membranu. Sutradan je membrana isprana u TBS puferu (25 mmol dm^{-3} Tris-HCl pH = 7,5, 150 mmol dm^{-3} NaCl, 0,2 % (v/v) *Tween*) $3 \times 10 \text{ mL}$, te inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi u otopini odgovarajućih primarnih antitijela (za GAL4 DNA veznu domenu, odnosno aktivacijsku domenu razrijeđena su bila $200 \times$, za (His)₆, te za GST $1000 \times$ u puferu za blokiranje). Po završetku, membrana je isprana kao i prethodni put, te potopljena u otopini odgovarajućih sekundarnih antitijela (za uzorke s primarnim antitijelima za GAL4 i (His)₆ korištena su mišja, te za GST kozja sekundarna $10\,000 \times$ razrijeđena u puferu za blokiranje). Nakon ispiranja, membrana je potopljena 1 minutu u 2 ml detekcijske otopine nastale miješanjem jednakih volumena otopina A i B iz komercijalnog kompleta *LumiGlo (KPL)* pri čemu je došlo do pojave kemiluminiscencije koja je detektirana na fotografskom filmu u tamnoj komori. Korištena sekundarna antitijela imaju na sebi vezanu

vodikovu peroksidazu iz hrena koja u prisutnosti vodikovog peroksida prevodi luminol u ekscitirani intermedijrani dianion, koji vraćanjem u osnovno energetske stanje kemiluminiscira. Vremena ekspozicije su varirana za različita antitijela i proteine od interesa od nekoliko sekundi do sat vremena, nakon čega su filmovi uronjeni u otopinu razvijача (Kodak) razrijeđenu 5 puta, inkubirani 2 minute, isprani vodom i potom fiksirani 2 minute u otopini razvijача (Kodak) razrijeđenoj 5 ×.

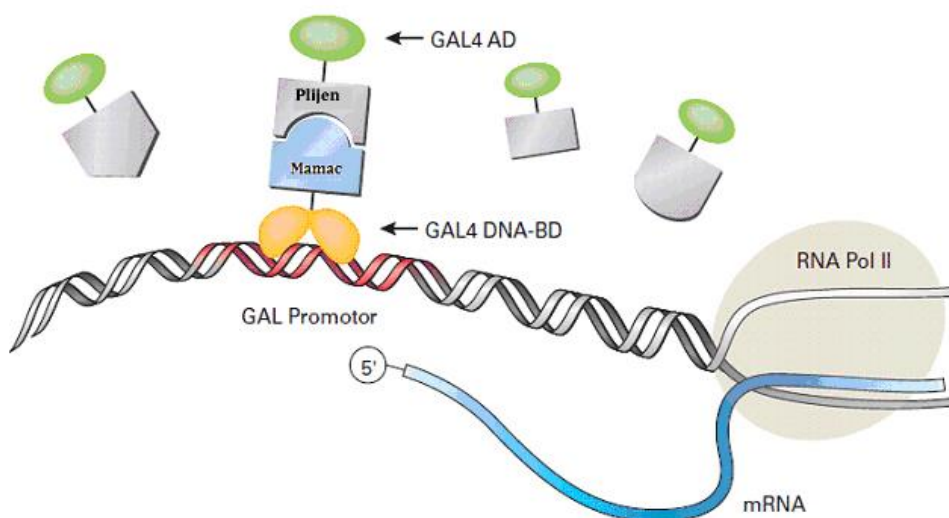
3.3.10. Modeliranje trodimenzionalne strukture proteina

Predikcije trodimenzionalnih struktura proteina napravljenе su uz pomoć internetskog servisa (PS)²-v2,^{113,114} a vizualizirane i obrađivane u programu *Pymol*.

3.4. Proteinske interakcije

3.4.1. Kvašćev sustav dvaju hibrida

Detekcija proteinskih interakcija *in vivo* kvašćevim sustavom dvaju hibrida (eng. *yeast two-hybrid*, Y2H) temelji se na sposobnosti preživljavanja auksotrofnih kvasaca na selektivnim podlogama kao posljedice interakcije heterolognog proteina od interesa s drugim proteinima, pri čemu stanica kvasca služi kao svojevrsni "reakcijski medij". Protein od interesa, tzv. *protein mamac*, eksprimiran je u obliku fuzije s DNA-veznom domenom transkripcijskog faktora GAL4 na svome N-kraju koja mu omogućuje ulazak u staničnu jezgru i vezanje na uzvodnu aktivacijsku sekvencu gena izvjestitelja (HIS3, ADE2, lacZ, MEL1). Potencijalni interakcijski partner, tzv. *protein plijen* eksprimiran je u obliku fuzije s GAL4-aktivacijskom domenom, koja i njemu omogućuje ulazak u jezgru. Ukoliko protein mamac i protein plijen međusobno interagiraju, tada će se njihove fuzijske GAL4-domene naći vrlo blizu jedna drugoj i djelovati aktivacijski na promotor gena izvjestitelja koji auksotrofnim kvascima omogućuju preživljavanje na selektivnim hranjivim podlogama (slika 11.).¹⁰¹



Slika 11. Shematski prikaz metode kvašćevih dvaju hibrida: protein mamac na svome N-kraju nosi GAL4 DNA veznu domenu kojim naliže na GAL-promotorsku regiju koja se nalazi ispred izvjestiteljskog gena. Protein plijen s druge strane postoji kao fuzija s GAL4-aktivacijskom domenom. Ukoliko dolazi do interakcije proteina mamac i proteina plijena, GAL4-aktivacijska domena dolazi u neposrednu blizinu GAL4 DNA-vezne domene, što za posljedicu ima aktivaciju GAL-promotora i potom gena izvjestitelja (preuzeto iz¹⁰¹).

U ovom radu protein mamac bio je SerRS, cDNA koja ga kodira nalazila se u vektoru pGBKT7 kojim je transformiran haploidni i auksotrofni soj kvasca Y187. Uspješnost ekspresije SerRS u kvascu provjerena je *western-hibridizacijskom* analizom korištenjem GAL4 DNA BD antitijela. cDNA knjižnice koje su kodirale potencijalne proteine plijenove iz biljke *A. thaliana* nalazile su se u vektorima pGADT7 AD u haploidnom i auksotrofnom soju kvasca AH109. Korištene su dvije vrste cDNA knjižnica: oligo dT cDNA knjižnica koja je konstruirana tako da su u reverznoj transkripciji kao početnice korišteni oligonukleotidi deoksitimidina koji se vežu na komplementarne poliadeninske repove mRNA omogućujući dobivanje fragmenata cDNA koji odgovaraju 3'-krajevima gena, te *random primed* cDNA knjižnica koja je konstruirana tako da su kao početnice u reverznoj transkripciji korišteni nasumični heksameri koji se vežu na različita mjesta molekule mRNA i time povećavaju raznovrsnost cDNA fragmenata. Obje cDNA knjižnice pripremljene su na temelju mRNA dobivenih iz klijanaca biljke *A. thaliana*, a dobivene su ljubaznošću prof. dr. sc. Wolfganga Werra (University of Koeln, Germany).

Priprema za detekciju započela je inokulacijom 50 ml selektivne -Trp tekuće hranjive podloge (sastav (v/v): 5 % DO otopine 20 × koncentrirane, 50 % SD otopine 2 × koncentrirane, 5 % otopine leucina 20 × koncentrirane, 5 % otopine histidina 20 × koncentrirane, 5 % otopine adenina 20 × koncentrirane) kvascima soja Y187 s plazmidom pGBKT7 i cDNA za SerRS, potom inkubacijom na 30 °C uz protresanje od 200 okretaja po minuti. Rast kvasaca praćen je mjerenjem optičke gustoće pri 600 nm, te kada je postignuta vrijednost $OD_{600} = 0,8$ stanice su oborene centrifugiranjem na $1000 \times g$ kroz 5 minuta, supernatant je uklonjen, talog je resuspendiran u 5 ml -Trp medija, broj stanica određen je hemocitometrom (mora biti veći od 1×10^8), te mu je dodano 990 μL otopine kvasaca soja AH109 transformiranih plazmidima pGADT7 AD s cDNA knjižnica (10 μL ove otopine sačuvano je za određivanje titra kvašćevih stanica transformiranih vektorima cDNA knjižnice). Smjesa je prenesena u Erlenmayerovu tikvu od 2 L u koju je prethodno dodano 45 ml 2 × koncentrirane YPDA tekuće hranjive podloge, kanamicin do konačne koncentracije $50 \mu g ml^{-1}$, te je provedena inkubacija na 30 °C uz miješanje brzinom od 30 okretaja po minuti. Nakon 20 sati smjesa je uzorkovana i pregledana mikroskopom s faznim kontrastom radi utvrđivanja postojanja diploidnih zigota koje su nastale stapanjem haploidnih stanica kvasaca. U slučaju pozitivnog nalaza, stanice kvašćeve kulture oborene su centrifugiranjem na $1000 \times g$ 10 minuta, tikva je isprana još dva puta s po 50 ml 0,5 × koncentriranog YPDA tekućeg medija s kanamicinom kako bi se pokupile na stijenkama zaostale stanice, otopina je s prethodnim talogom ponovno centrifugirana i konačni talog je resuspendiran u 10 mL 0,5 × koncentriranog YPDA tekućeg medija s kanamicinom (100 μL ove otopine sačuvano je za određivanje broja pretraženih diploidnih stanica). Suspenzija stanica nasadena je na krute hranjive podloge -Trp / -Leu (sastav identičan otopini -Trp, osim što ne sadrži još i leucin, te je dodan agar do koncentracije $20 g dm^{-3}$) tzv. niske selektivnosti, koje su potom inkubirane na 30 °C. Nakon 5 dana nastale kvašćeve kolonije presađene su na krute hranjive podloge tzv. umjerene selektivnosti -Trp / -Leu / -His (sastav identičan otopini -Trp, bez leucina i histidina, te je dodan agar do koncentracije $20 g dm^{-3}$) i -Trp / -Leu / -Ade (sastav identičan otopini -Trp, bez leucina i adenina, te je dodan agar do koncentracije $20 g dm^{-3}$). Podloge su inkubirane 5 dana na 30 °C, te su preživjele kolonije presađene na podloge tzv. visoke selektivnosti -Trp / -Leu / -His / -Ade (sastav identičan otopini -Trp, bez leucina, histidina i adenina, te je dodan agar do koncentracije $20 g dm^{-3}$). Postepeno povećavanje selektivnosti hranjivih podloga omogućilo je provjeru aktivnosti više različitih gena izvjestitelja radi

uklanjanja lažno pozitivnih kolonija. One kolonije koje su nastavile rast i na podlogama visoke selektivnosti podvrgnute su izolaciji plazmidnih DNA koje su potom sekvencirane, te je upotrebom programa BLAST određeno za koje proteine kodiraju, odnosno o kojim se potencijalnim proteinskim interaktorima SerRS radi. Za svaki od interaktora ponovljen je interakcijski test sa SerRS tako da su u 500 μ L YPDA medija s kanamicinom zajedno resuspendirane: kolonija kvasca soja Y187 koja je sadržavala SerRS i kolonija kvasca soja AH109 koja je transformirana s DNA odgovarajućeg potencijalnog interaktora. Smjesa je inkubirana 24 sata na 30 °C uz miješanje brzinom od 200 okretaja po minuti, nakon čega je nasadena na visoko selektivne ploče koje su inkubirane 5 dana. Također, svaki interaktor podvrgnut je provjeri samostalne aktivacije gena izvjestitelja na način da su kvasci soja AH109 koji su sadržavali potencijalne interaktore nasadivani na visoko selektivne podloge kako bi se dodatno isključili lažni pozitivni. Kao pozitivna kontrola interakcije korištene su diploidne stanice s vektorom pBD-GAL4 (sadržavao gen za protein ITEP) i pAD-GAL4 (sadržavao gen za protein FNR, interagirajući partner ITEP-u). Ovi plazmidi dobiveni su ljubaznošću dr. sc. Branke Jeličić. Korištene su dvije vrste negativnih kontrola: diploidne stanice s praznim vektorima pGBKT7 i pGADT7 AD, odnosno s vektorom pGBKT7 u kojem je ubačen gen za SerRS i praznim vektorom pGADT7 AD.

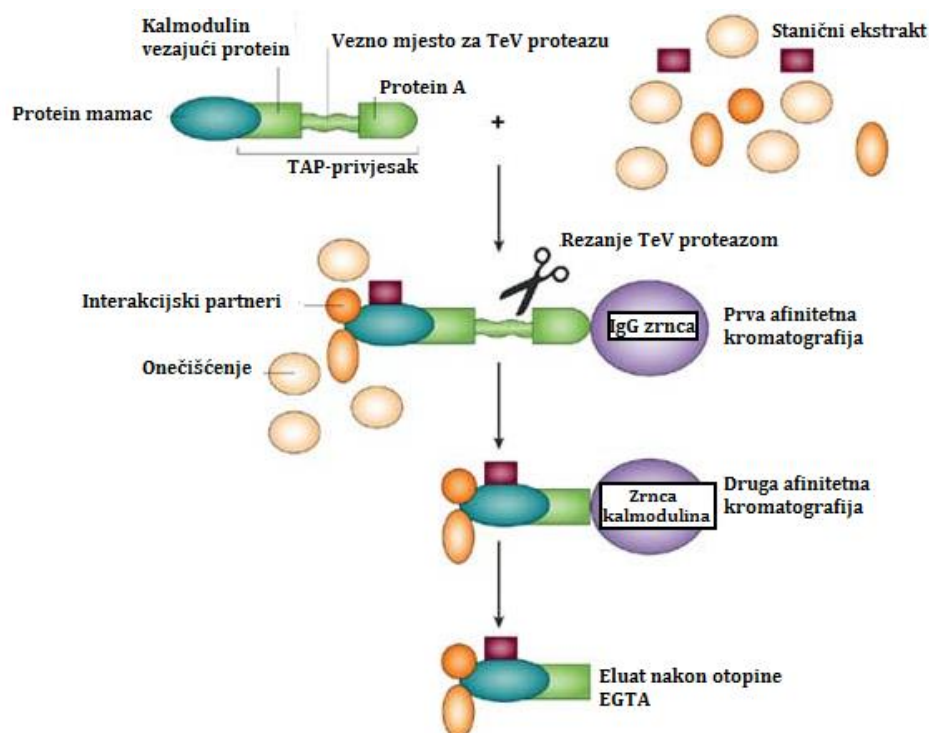
Za određivanje titra korištene cDNA knjižnice (tj. broja cDNA klonova u 1 mL), 10 μ L otopine kvasaca transformiranih plazmidima korištene cDNA knjižnice pomiješano je s 1 mL YPDA medija s kanamicinom i vorteksirano. Ovo je označeno kao otopina A. Deset μ L ove otopine pomiješano je s novih 1 mL YPDA medija s kanamicinom i vorteksirano. Ovo je označeno kao otopina B. Deset μ L otopine A dalje je pomiješano s 50 μ L YPDA medija s kanamicinom, vorteksirano i nasadeno na -Leu krutu hranjivu podlogu (sastav (v/v): 5 % DO otopine 20 \times koncentrirane, 50 % SD otopine 2 \times koncentrirane, 5 % otopine triptofana 20 \times koncentrirane, 5 % otopine histidina 20 \times koncentrirane, 5 % otopine adenina 20 \times koncentrirane). 50 μ L otopine B pripremljeno je na jednak način i nasadeno na -Leu podlogu. Podloge su inkubirane na 30 °C 3 dana, a tada su nastale kolonije prebrojene i izračunat je titar (cfu mL^{-1} (eng. *colony forming unit*)) prema formuli: broj kolonija / (volumen otopine stanica inokuliranih na podlogu \times faktor razrijeđenja).

3.4.1.1. X-gal filter test

Jedan od gena izvjestitelja je i onaj koji kodira za enzim β -galaktozidazu što omogućuje brzu i jednostavnu vizualnu detekciju kolonija kvasca u kojima se dogodila interakcija između proteina mamca i proteina plijena. Stanice u kojima je aktivna β -galaktozidaza imaju mogućnost razgradnje šećera 5-brom-4-klor-hidroksiindolil- β -D-galaktopiranozida (X-gal) uslijed čega nastaje plavo obojenje koje potječe od 5,5'-dibrom-4,4'-diklor-indiga. Test se provodi tako da se kolonije kvasca uzgojene na krutoj hranjivoj podlozi otisnu na filter papir koji se pohrani na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći kako bi došlo do razbijanja stanica, budući da X-gal ne može proći kroz staničnu stijenku kvašćevih stanica. Idući dan filter papir (sa stanicama okrenutim prema gore) se prelije agaroznim gelom i inkubira 30 minuta na $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Smjesa za gel pripremljena otapanjem agaroze ($\gamma = 7\text{ g dm}^{-3}$) u Z-puferu (natrijev hidrogenkarbonat $c = 60\text{ mmol dm}^{-3}$, natrijev dihidrogenkarbonat $c = 45\text{ mmol dm}^{-3}$, kalijev klorid $c = 10\text{ mmol dm}^{-3}$ i magnezijev sulfat $c = 1\text{ mmol dm}^{-3}$) uz zagrijavanje, nakon čega je dodan β -merkaptetanol (konačne koncentracije 40 mmol dm^{-3}) i X-gal (konačna koncentracija 20 g dm^{-3}).

3.4.2. Metoda afinitetnog supročišćavanja spregnuta spektrometrijom masa

Metoda afinitetnog supročišćavanja spregnuta spektrometrijom masa (eng. *tandem affinity purification- mass spectrometry (TAP-MS)*) još je jedna od metoda koja služi detekciji interakcije proteina mamca i proteina plijena. Protein mamac nadeksprimiran je u transgeničnom organizmu u obliku fuzije s tzv. TAP privjeskom na C-kraju koji omogućuje pročišćavanje interakcijskog kompleksa nizom afinitetnih kromatografija. TAP privjesak čine kalmodulin-vezujući peptid, vezno mjesto za proteazu TeV (eng. *tobacco etch virus*) i protein A s velikim afinitetom vezanja na imunoglobuline G (IgG).¹¹⁰ U ovom radu korištene su prethodno pripremljene transgenične biljke *A. thaliana* (dobivene ljubaznošću dr. sc. Nataše Bauer) s nadeksprimiranim SerRS-TAP kao proteinom mamcem. Nakon 22 dana uzgoja na



Slika 12. Shematski prikaz metode afinitetnog supročišćavanja: Protein mamac eksprimira se u obliku fuzije s TAP-privjeskom (sadrži vezno mjesto za kalmodulin, vezno mjesto za proteazu TeV i Protein A), te se nakon homogenizacije stanica pročišćava u kompleksu sa svojim potencijalnim interaktorima dvjema afinitetnim kromatografijama. Prvo se kompleks proteina nanosi na matriks s imunoglobulinom G, nakon uklanjanja nečistoća, eluira se djelovanjem proteaze TeV koja dokida vezu između proteina A i kalmodulin-vezujućeg proteina u TAP privjesku fuzijskog proteina. Potom slijedi druga afinitetna kromatografija na matriksu s kalmodulinom (preuzeto i prilagođeno iz¹¹⁶).

krutoj hranjivoj podlozi MS sakupljeno je 5 g transgeničnih biljaka i 11 g biljaka divljeg tipa koje su korištene kao kontrola metode. Transgenične biljke i biljke divljeg tipa su odvojeno homogenizirane u tarionicima ohlađenim tekućim dušikom u puferu za ekstrakciju proteina (50 mmol dm⁻³ Tris-HCl pH = 7,5, 100 mmol dm⁻³ NaCl, 0,1 % (v/v) Tween, 5% (v/v) glicerol, 0,5 mmol dm⁻³ EDTA, 1 mmol dm⁻³ PMSF, 1 mmol dm⁻³ DTT, inhibitori proteaza *Complete Protease Inhibitor Coctail* (Roche): 1 tableta za svakih 10 mL pufera), tako da je za svakih 0,5 g tkiva dodano 1 ml pufera. Homogenizati su centrifugirani 15 minuta na 5000 × g na 4 °C, supernatanti su odvojeni i dodatno centrifugirani 30 minuta na 10 000 × g na 4 °C. Bistri supernatanti sadržavali su topljive frakcije biljnih proteina čija koncentracija je određena metodom po Bradfordu, a kvaliteta izoliranih proteina SDS-poliakrilamidnom elektroforezom. Proteinski ekstrakti su inkubirani svaki s 300 µL smole *IgG Sepharose 6 Fast*

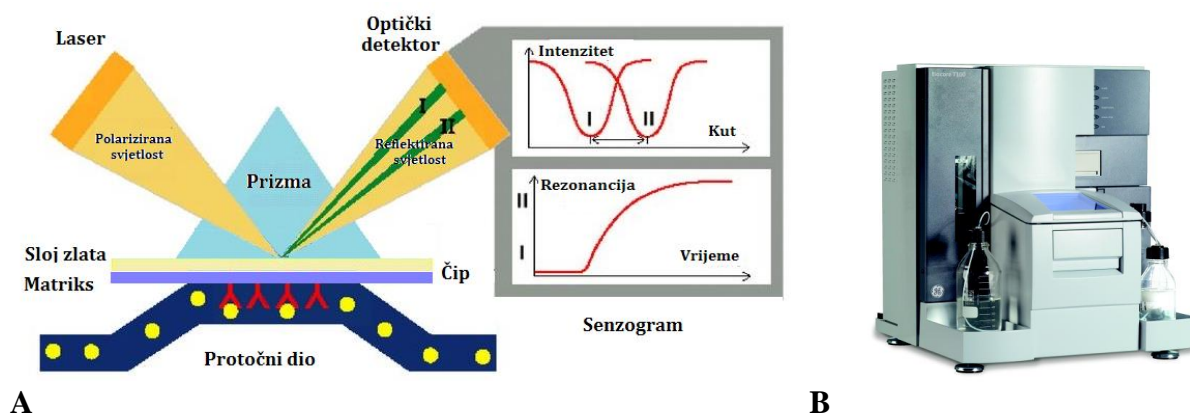
Flow (GE Healthcare) 3 sata na 4 °C uz miješanje kako bi se interakcijski kompleks SerRS preko proteina A u TAP privjesku vezao za IgG na smoli. Smola je prethodno isprana s 1,5 mL pufera za ispiranje ($50 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ K}_2\text{PO}_4$ pH = 7,2, $1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ MgCl}_2$, 20 % (v/v) etanol), te aktivirana dodavanjem octene kiseline ($0,5 \text{ mol dm}^{-3}$) uz ispiranje s 1,5 mL pufera za ispiranje (korak aktivacije ponovljen je $2 \times$). Nakon inkubacije smola je isprana $3 \times$ sa 10 mL pufera za ispiranje čime su uklonjene nečistoće i nevezani proteini. Interakcijski kompleks uklonjen je sa smole dodatkom 20 μL proteaze TeV ($7,23 \text{ g dm}^{-3}$) pripremljene u matičnom laboratoriju u 1 mL pufera za ispiranje uz prekonoćnu inkubaciju na 4 °C uz miješanje. Idući dan smjesa je propuštena kroz praznu kolonu kako bi se smola odvojila od eluata koji je sadržavao interakcijski kompleks. Odvojeni su alikvoti za kontrolnu SDS-poliakrilamidnu elektroforezu, a eluat je pomiješan s 300 μL kalmodulinskih zrnaca *Calmodulin Sepharose 4B* (GE Healthcare) prethodno ispranih u puferu za vezanje ($50 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Tris-HCl}$ pH = 7,5, $100 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NaCl}$, $10 \text{ mmol dm}^{-3} \beta\text{-merkaptoetanol}$, $1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ imidazol}$, $1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ magnezijev acetat}$, $2 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$, 5% (v/v) glicerol, 0,1 % *Tween*), otopinom CaCl_2 (do konačne koncentracije $2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) i puferom za vezanje volumena $3 \times$ volumen eluata. Inkubacija je trajala 2 sata na 4 °C uz miješanje. Zrnca su potom isprana $4 \times$ istim puferom, nanosena na praznu kolonu, a elucija je postignuta dodatkom 400 μL elucijskog pufera (sastav kao i u puferu za vezanje, osim što ne sadrži CaCl_2 , već $20 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ EGTA}$) uz 5 minuta inkubacije (ovo je ponavljano $5 \times$). Odvojeni su alikvoti za kontrolnu SDS-poliakrilamidnu elektroforezu. Proteini u eluatu su istaloženi dodavanjem jednakog volumena 20 % (w/v) trikloroctene kiseline uz inkubaciju 30 minuta na ledu i potom centrifugiranjem 15 minuta na $10\,000 \times G$ na 4 °C. Talog je resuspendiran u 300 μL hladnog acetona, smjesa je inkubirana 5 minuta na ledu i potom centrifugirana na jednak način kao i ranije. Dobiveni talog rasuspendiran je u puferu za nanošenje na SDS-poliakrilamidni gel, te je provedena elektroforeza. Po završetku, proteini na gelu su vizualizirani bojanjem u otopini *Coomassie brilliant blue* boje, proteinske vrpce su sterilnim priborom odvojeno izrezane i usitnjene na male komadiće. Uklanjanje boje napravljeno je inkubiranjem komadića gela u 500 μL otopine za ispiranje (50 % (v/v) acetonitril, $25 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$) $3 \times$. Dehidracija gela postignuta je inkubiranjem odbojanih komadića gela u 200 μL otopine 100 % (v/v) acetonitrila 10 minuta, nakon čega je uslijedilo sušenje komadića gela u uređaju *SpeedVac* (Thermo) 10 minuta. Redukcija disulfidnih veza u proteinima postignuta je inkubiranjem komadića gela u 200 μL redukcijske otopine ($10 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ DTT}$,

25 mmol dm^{-3} NH_4HCO_3) na 56 °C kroz 45 minuta. Nakon ispiranja provedena je alkilacija cisteinskih ostataka u 200 μL alkilacijske otopine (55 mmol dm^{-3} jodoacetamid, 25 mmol dm^{-3} H_4HCO_3) kroz 60 minuta u mraku, kako bi se trajno onemogućilo regeneriranje tercijarne strukture proteina. Ponovljeno je ispiranje, dehidracija i sušenje, te je na komadiće gela dodano 50 μL otopine tripsina (12,5 ng μL^{-1}). Nakon inkubacije 10 minuta na 25 °C, smjesama je dodano 150 μL NH_4HCO_3 (25 mmol dm^{-3}), te je inkubacija nastavljena preko noći. Idući dan smjese su centrifugirane, supernatanti koji su sadržavali otopljene proteinske fragmente su odvojeni, a komadići gela su podvrgnuti daljnjoj ekstrakciji zaostalih proteinskih fragmenata. Ovo je napravljeno u tri koraka koja su se sastojala od dodavanja otopine za ekstrakciju: 3 % (w/v) trifluoroctene kiseline (TFA) i acetonitrila u rastućim udjelima ((v/v) 30 %, 80 %, 100 %), uz centrifugiranje i odvajanje supernatanta. U prvom i drugom koraku dodano je 150 μL , odnosno u trećem 70 μL otopine za ekstrakciju. Svi supernatani za pojedini uzorak su po završetku ekstrakcije spojeni i upotrebom uređaja *SpeedVac* volumeni su im svedeni na volumen prvog supernatanta. Otopine proteinskih fragmenata nanosene su na membrane *StageTip*, *C-18* (*Thermo*) kolona koje su prethodno aktivirane metanolom i uravnotežene otopinom (1 % (w/v) TFA, 2 % (v/v) acetonitril). Kolone su centrifugirane na $1000 \times g$ kroz 1 minutu i isprane s 0,5 % (v/v) octene kiseline, te ponovno centrifugirane. Analiza peptidnih ostataka potencijalnih proteinskih interaktora SerRS-a, odnosno peptida kontrolnih biljaka divljeg tipa napravljena je u servisu za spektrometriju masa Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.4.3. Metoda rezonancije površinskih plazmona

Relativno mala količina ispitivane tvari u reakciji, mogućnost rada s neobilježenim jedinkama, te sposobnost praćenja asocijacije i disocijacije čine metodu rezonancije površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance* (*SPR*)) povoljnom metodom u *in vitro* istraživanju proteinskih interakcija. Sustav čine optički i protočni dio između kojih se nalazi tzv. čip, sastavljen od tankog sloja zlata na koji se naslanja površinski matriks za vezanje ispitivane tvari. Lasersko zračenje ogiba se na sloju atoma zlata i analizira u detektoru. Manji dio zračenja apsorbiraju elektroni atoma zlata pri čemu nastaje elektronski val koji putuje površinom sloja okrenutom prema matriksu (tzv. površinski plazmon), a što izaziva smanjivanje intenziteta reflektirane svjetlosti pri određenom kutu. Kako kut ogiba značajno ovisi o razlici indeksa loma svjetlosti medija s jedne i druge strane sloja zlata (stakla prizme i

matriksa), vezanjem proteina na matriks i/ili uspostavom proteinskih interakcija, dolazi do promjene kuta ogiba, odnosno fenomena rezonancije površinskih plazmona.¹¹¹



Slika 13. A Princip detekcije u metodi rezonancije površinskih plazmona: Lasersko zračenje ogiba se na sloju atoma zlata i analizira u detektoru. Manji dio zračenja apsorbiraju atomi zlata pri čemu nastaje elektronski val koji putuje površinom sloja okrenutom prema matriksu- površinski plazmon. Promjena kuta ogiba laserske zrake ovisna je o razlici indeksa loma svjetlosti s jedne i druge strane sloja zlata (stakla prizme i matriksa). Veza proteina na matriks (reflektirana svjetlost I) i/ili uspostavom proteinskih interakcija (reflektirana svjetlost II) dolazi do promjene kuta ogiba svjetlosti, odnosno fenomena rezonancije površinskih plazmona. **B** Instrument za izvođenje metode rezonancije površinskih plazmona *Biacore T100* (*GE Healthcare*) (preuzeto i prilagođeno iz¹⁰⁰).

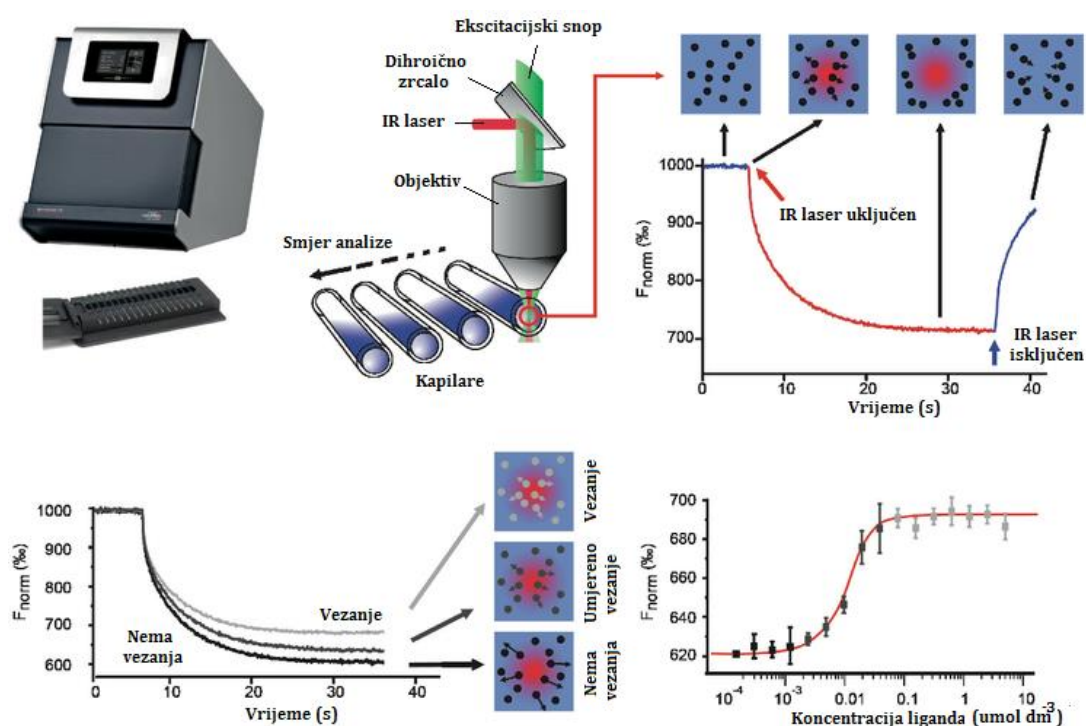
U ovom radu korišten je uređaj *Biacore T100* (*GE Healthcare*), te čipovi *Series S Sensor Chip CM5* (CM5) i *Series S Sensor Chip NTA* (NTA) (*GE Healthcare*). CM5 čip sadržavao je četiri odvojena reakcijska prostora (ćelije) iskorištena za ispitivanje interakcije SerRS -a i proteina BEN1 na način da je u jednoj reakciji na matriks bio imobiliziran SerRS, dok je BEN1 bio u mobilnoj fazi. U drugoj reakciji napravljen je obrat. Preostale dvije ćelije korištene su za provjeru nespecifičnog vezanja ovih proteina na matriks. Proteini su imobilizirani na karboksimetil dekstranski matriks kovalentnim povezivanjem primarnih amina sa suksinimidnim esterima nastalih aktivacijom karboksilnih ostataka matriksa. Za aktivaciju je korištena smjesa jednakih volumena $0,4 \text{ mol dm}^{-3}$ 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimida (EDC) i $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ N-hidroksisukcinimida (NHS). Protein je pomiješan s natrijevim acetatom (do konačne koncentracije $7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$) odgovarajuće niskog pH (u ovom radu je korišten $\text{pH} = 5,0$) kako bi ukupan neto naboj proteina bio pozitivan (što omogućuje vezanje na negativno nabijene karboksilne ostatke matriksa¹¹⁶), a konačna

koncentracija proteina za imobilizaciju iznosila je od 10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Efikasnost imobilizacije određena je iz odziva rezonancije (RU, eng. *response unit*), te su preostala slobodna vezna mjesta na čipu blokirana propuštanjem otopine 1 mol dm^{-3} etanolamin hidroklorida. Drugi protein serijski je razrijeđen u puferu HBS (50 mmol dm^{-3} Hepes pH = 7,4, 140 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 0,05 % (w/v) P20), te je ispitana interakcija i napravljena titracija u rasponu koncentracija $10 \times$ manje, odnosno veće vrijednosti od očekivane vrijednosti konstante disocijacije. Regeneracija čipa provedena je propuštanjem 5-10 mmol dm^{-3} otopine NaOH. Svi eksperimentni rađeni su pri 25 °C.

NTA čip sadrži karboksimetil dekstranski matriks s preimobiliziranom nitriloacetatnom kiselinom koja kelira niklove ione, što omogućuje afinitetno vezanje proteina označenih (His)₆-privjeskom. U ovom radu na NTA čip vezan je SerRS(His)₆ (korištena koncentracija 0,2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), a po završetku reakcije čišćenje je provedeno prvim propuštanjem otopine 0,5 mol dm^{-3} EDTA, odnosno drugim propuštanjem otopine 50 mmol dm^{-3} NaOH. Regeneracija matriksa napravljena je otopinom 0,5 mol dm^{-3} NiCl_2 .

3.4.4. Mikrotermoforeza

Metoda mikrotermoforeze (eng. *microscale thermophoresis (MST)*) podrazumijeva mjerenje kretanja molekula u otopini u mikroskopskom temperaturnom gradijentu. Priroda gibanja molekula ovisi i mijenja se zavisno o promjenama u hidratacijskom omotaču, naboju ili veličini molekula. Uslijed interakcije dolazi do promjene ovih parametara, a time i samog kretanja molekula, što se prati mjerenjem promjene fluorescencije jednog od potencijalnih partnera koji je fluorescentno obilježen (ili posjeduje intrinzičnu fluorescenciju).¹¹² Mikroskopski temperaturni gradijent izazvan je kratkotrajnim pulsom infracrvenog lasera u malom volumenu kapilare. U ovom radu MST je korištena za ispitivanje interakcija cjelovitog SerRS, te skraćenih varijanti SerRS-a s cjelovitim BEN1, odnosno skraćenom varijantom proteina BEN1 (fluorescentno su obilježeni SerRS, BEN1 i skraćeni BEN1). Otopina fluorescentne boje 647NT *Red dye (Nanotemper)* pripremljena je otapanjem praha boje u 100 % (w/v) dimetilsulfoksida do konačne koncentracije 435 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Sto μL otopine proteina (20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) u puferu koji nije sadržavao slobodne primarne amine pomiješano je s otopinom boje do ukupnog volumena od 200 μL tako da koncentracija boje bude 2-3 puta veća od koncentracije proteina, što je podešeno dodavanjem komercijalnog pufera za



Slika 14. Metoda MST podrazumijeva mjerenje kretanja fluorescentno obilježenih molekula u otopini u mikroskopskom temperaturnom gradijentu izazvanom kratkotrajnim laserskim pulsom. Uslijed molekulske interakcije dolazi do promjene u hidratacijskom omotaču, naboju ili veličini molekula što mijenja karakteristike kretanja obilježene molekule u kapilari instrumenta, a što je moguće okarakterizirati mjerenjem promjene fluorescencije (preuzeto i prilagođeno iz¹¹²).

označavanje (*Nanotemper*). Obilježavanje je nastavljeno inkubacijom 30 minuta u mraku. Po završetku smjesa je nanosena na gel-filtracijsku kolonu *Column B* (*Nanotemper*) koja je prethodno isprana i uravnotežena s 9 ml pufera HBS (50 mmol dm^{-3} Hepes pH = 7,4, 150 mmol dm^{-3} NaCl, 5 mmol dm^{-3} MgCl_2 , 0,05 % (v/v) *Tween*) kako bi se uklonio višak boje. Potom je na kolonu dodano $600 \mu\text{L}$ pufera HBS, te je skupljen eluat. Koncentracija obilježenog proteina određena je preko Lambert-Beerovog zakona iz omjera apsorbancija pri 650 nm (apsorpcijski maksimum boje vezane za protein) i 280 nm (apsorpcijski maksimum proteina), te je za postavljanje reakcije titracije podešena tako da odziv fluorescencije bude u rasponu od 200-1 500 jedinica. Za svaku reakciju titracije pripremljeno je 16 serijski razrijeđenih otopina neobilježenog proteina u koje je dodan jednak volumen obilježenog proteina do konačnog reakcijskog volumena od $20 \mu\text{L}$. Početna otopina sadržavala je maksimalno dostupnu koncentraciju neobilježenog proteina. Reakcijske smjese nanosene su u

kapilare čije su stijenke bile presvučene hidrofilnim premazom što smanjuje nastajanje proteinskih agregata, te su mjerenja vršena pri snazi lasera od 20, odnosno 40 %, te temperaturi od 25 °C.

3.5. Mikroskopska analiza

Fluorescencijska mikroskopska analiza napravljena je na invertnom mikroskopu *Axiovert 200 M* upravljanom *AxioVision 4.5* programom uz korištenje filterskog kompleta 13 (ekscitacijski filter BP 470/20, emisijski filter 505-530) (*Zeiss*). Za konfokalnu mikroskopsku analizu korišten je *Leica TCS SP2 AOBS (Leica)* konfokalni pretražni mikroskop. Ekscitacija GFP fluoroformi i klorofila postignuta je argonskim laserom na 488 nm. Emisija GFP signala i autofluorescencija klorofila analizirana je na 500-535 nm, odnosno 650-700 nm na dva odvojena kanala. Signal 4',6-diamino-2-fenilindola (DAPI) analiziran je zasebno na 461 nm. Protoplasti *A. thaliana* bojani su otopinom DAPI boje ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ u PBS puferu) na način da su stanice uronjene u otopinu boje kroz 30-60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Za konfokalnu mikroskopsku analizu transgeničnih biljaka koje nadeksprimiraju GFP-SerRS korišten je konfokalni pretražni mikroskop LSM780 (*Zeiss*) na Institutu za molekularnu biologiju biljaka u Strasbourgu.

3.6. Priprema sjemeni, uzgoj biljaka i analiza utjecaja abiotičkih stresora

Prije nasađivanja na krute medije MS potrebno je s površine sjemenki *A. thaliana* ukloniti mikroorganizme koji bi mogli zagaditi hranjive medije. Ovo je postignuto potapanjem sjemenki 1 minutu u 70 % (v/v) etanolu, zatim inkubacijom u 4 % (v/v) otopini NaClO 15 minuta uz protresanje, nakon čega su sjemenke isprane $5 \times$ sterilnom vodom. Kako bi se spriječilo nejednoliko klijanje, sjemenke su nakon sterilizacije inkubirane 48 sati uronjene u sterilnoj vodi u posudi na 4 °C u mraku. Biljke su uzgajane u uvjetima dugog dana (16 sati svjetla i 8 sati mraka) kroz 7 dana, odnosno 14 u istraživanju utjecaja abiotičkih stresora na fenotip biljaka. Radi praćenja razlika u fenotipu između biljaka divljeg tipa, odnosno transgeničnih biljaka koje su nadeksprimirale SerRS, biljke su nasađene na hranjive podloge bez stresora, ali i na podloge s dodanim ionskim (NaCl, KCl), osmotskim stresorima (manitol), te teškim metalima (CdCl_2). Nakon tri dana od nasađivanja klijanci su svakodnevno

kroz period od 5 dana (osim za podloge u koje je dodan CdCl_2 , gdje su klijanci praćeni 7 dana) fotografirani, te je na fotografijama pomoću programa *ImageJ* određena duljina korijena. Ovi eksperimenti rađeni su u biološkim duplikatima kada je to god bilo moguće. Za genske ekspresijske analize biljke divljeg tipa i transgenične biljke nasađivane su na podloge MS bez stresora u triplikatima, dok su biljke divljeg tipa nasađivane i na podloge s NaCl u suvišku (50 mmol dm^{-3}), odnosno manitolom (100 mmol dm^{-3}) u duplikatima.

§ 4. REZULTATI

4.1. Enzimska aktivnost SerRS proteina

Istraživanja aaRS uglavnom su usmjerena na animalne aaRS, dok je podataka o biljnim aaRS relativno malo i to uglavnom s naglaskom na kukuruzne SerRS. Za citosolnu kukuruznu SerRS je pokazano da jednako učinkovito aminoacilira tRNA^{Ser} i bakterijskog i eukariotskog podrijetla. Ovako široka tRNA^{Ser} specifičnost nije primjećena kod SerRS proteina iz drugih organizama. S obzirom da je ovaj rad usmjeren na karakterizaciju citosolne SerRS iz modelne biljke *A. thaliana*, provjerena je specifičnost ovog enzima u prepoznavanju tRNA^{Ser} supstrata različitog evolucijskog podrijetla. U genomu biljke *A. thaliana* postoje dva gena koja kodiraju za SerRS enzime (dijele oko 34 % identiteta homologije na razini aminokiselinske sekvence). Jedan gen (TAIR oznaka: AT1G1187) kodira za organelnu varijantu SerRS enzima koja je dualno lokalizirana u kloroplastima i mitohondrijima, dok drugi gen (TAIR oznaka: AT5G27470) kodira za varijantnu SerRS enzima kojoj je predložena citosolna lokalizacija, a koji na svom C-kraju obiluje bazičnim aminokiselinama što je karakteristično za sve citosolne SerRS enzime (slika 15.).

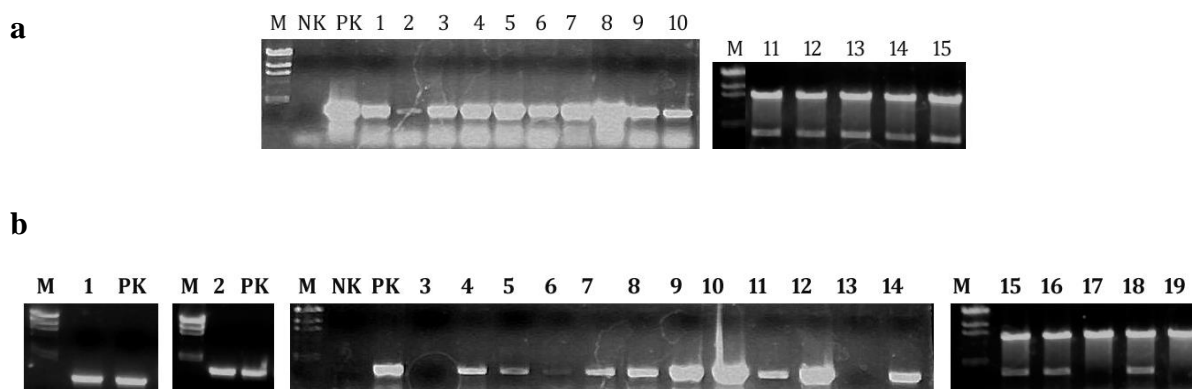
MLDINLFREE	KGNNPEIIRE	SQRRRFASVE	IVDEIIKLDK	EWRQRQFEVD
SFRKEFNKLN	KQVAQLKIKK	EDASEIIQQT	EKNKQDSTAK	EAEVREAYAA
LKAKLEQVGN	LVHDSVPVDK	DEANNLVIKL	WGEKRFSTPG	LKLKNHVDLV
ELLGIADTKR	GAEIAGARGF	FLKGDGLMLN	QALINFGTLF	LKKRGFTGLQ
PPFFMRKDVM	AKCAQLAQFD	EELYKVTGEG	DDKYLIATAE	QPLCAYHIDE
WIHPTELPLR	YAGYSSCFRK	EAGSHGRDTL	GIFRVHQFEK	IEQFCITGPN
ENASWEMLDE	MMKNSDFYQ	ALKLPYQIVS	IVSGALNDAA	AKKYDLEAWF
PSSETFRELV	SCSNCTDYQA	RRLEIRYGQK	KSNEQTKQYV	HMLNSTLTAT
ERTICCILEN	YQREDGVDIP	EVLQPFMGGE	TFLPF KAKPV	VAD TKGKKS A

Slika 15. Aminokiselinski slijed za protein SerRS (TAIR oznaka: AT5G27470) (deblje su otisnute hidrofilne aminokiseline na C-kraju proteina).

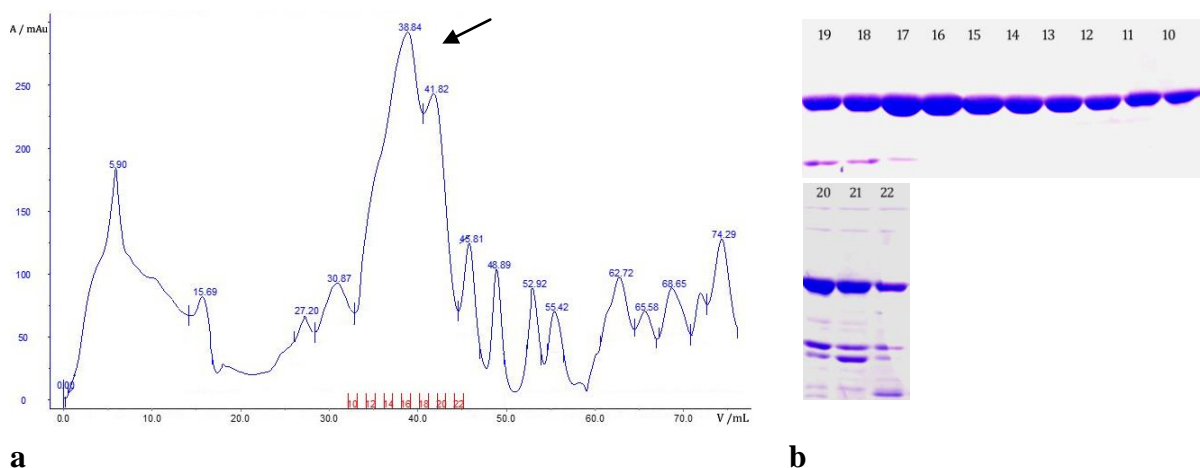
U svrhu određivanja aminoacilacijske aktivnosti i kinetičkih parametara K_M i k_{cat} pripremljene su dvije varijante citosolnog proteina SerRS: protein SerRS bez privjeska (SerRS) i protein SerRS s (His)₆-privjeskom na C-kraju (SerRS-His). Oba proteina pripremljena su na način da je nukleotidni kodirajući slijed (cDNA TAIR oznaka: U09339) umnožen u lančanoj reakciji

Pfu DNA-polimeraze i ubačen u vektor pET28b između restrikcijskih mjesta *NcoI* i *BamHI* u slučaju SerRS, odnosno između restrikcijskih mjesta *NcoI* i *NotI* u slučaju SerRS-His. Ovako pripremljeni vektori korišteni su za transformaciju stanica bakterije *E. coli*, te je kasnije na odabranim bakterijskim kolonijama proveden kolonijski PCR, odnosno izolacija plazmidne DNA i restrikcijska analiza (za konstrukt SerRS *NcoI* / *BamHI*, za konstrukt SerRS-His *NcoI* / *NotI*), odnosno sekvenciranje DNA čime je potvrđena uspješnost kloniranja (slika 16. a i b).

Optimalna ekspresija i dobivanje topljivih proteina u stanicama *E. coli* BL21 (DE3) postignuto je nakon indukcije s 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-om kroz 12 sati na 15 °C. Protein SerRS (pI = 6,27) pročišćen je na anionsko-izmjenjivačkoj kromatografskoj koloni *MonoQ* (GE Healthcare) u puferu pH = 8,0 (pri 4 °C), vrijednosti pH pri kojoj je ukupan naboj proteina negativan. Dobivene su frakcije vrlo visoke čistoće (slika 17.) koje su onda korištene za kinetičke eksperimente.

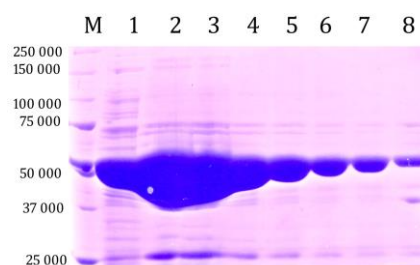


Slika 16. a: prikaz uzoraka DNA na 1 %-tnom (w/v) gelu agaroze za SerRS: M – λ DNA razgrađena s restrikcijskom endonukleazom *HindIII*; NK - negativna kontrola kolonijskog PCR-a, PK - pozitivna kontrola kolonijskog PCR-a, linije 1 – 10: rezultati kolonijskog PCR-a nakon ligacije plazmida pET28b s kodirajućim slijedom za SerRS i transformacije u *E. coli* DH5 α ; linije 11 – 15: rezultati kontrolne restrikcijske razgradnje plazmida pET28b s *NcoI* i *BamHI* radi potvrđivanja uspješnog kloniranja gena za SerRS. **b:** prikaz uzoraka DNA na 1 %-tnom (w/v) gelu agaroze za SerRS-His: M - λ DNA razgrađena s restrikcijskom endonukleazom *HindIII*; PK - pozitivna kontrola PCR reakcije; NK - negativna kontrola PCR reakcije; linija 1: produkt PCR reakcije za SerRS-His s *Taq* DNA-polimerazom; linija 2: produkt PCR reakcije za SerRS-His s *Pfu* DNA-polimerazom; linije 3 – 14: rezultati kolonijskog PCR-a nakon ligacije plazmida pET28b s kodirajućim slijedom za SerRS-His i transformacije u *E. coli* DH5 α ; linije 15 – 19: rezultati restrikcijske razgradnje plazmida pET28b s *NcoI* i *NotI* radi potvrđivanja uspješnog kloniranja gena za SerRS-His.



Slika 17. Pročišćavanje proteina SerRS na anionsko-izmjenjivačkoj koloni *MonoQ* (*GE Healthcare*). **a:** prikaz kromatograma (strelicom je označena pozicija elucije SerRS); **b:** analiza eluiranih frakcija na 9 %-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu.

Protein SerRS-His pročišćen je afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (slika 18.). Dobivene frakcije nakon elucije pokazuju visok prinos SerRS-His, te nisu dodatno pročišćavane, već su kao takve korištene za daljnje kinetičke analize.



Slika 18. Analiza eluiranih frakcija nakon afinitetne Ni-NTA kromatografije na 9 %-tnom SDS-poliakrilamidnom gelu.

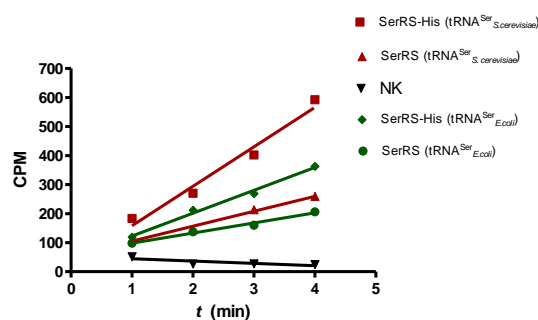
4.1.1. Određivanje aminoacilacijske aktivnosti različitih varijanti enzima SerRS

Aminoacilacijska aktivnost SerRS i SerRS-His određena je mjerenjem radioaktivnog raspada izotopa [^{14}C] u serinu koji je korišten kao jedan od supstrata. Drugi supstrat bile su ukupna tRNA iz kvasca *S. cerevisiae*, odnosno bakterije *E. coli* (prethodno im je određen maseni udio tRNA^{Ser} i on je iznosio $w(\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{S. cerevisiae}) = 0,66 \%$, $w(\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{E. coli}) = 4,16 \%$). Nakon dodatka enzima ($c = 5 \text{ nmol dm}^{-3}$) i početka reakcije, smjesa je uzorkovana nakon svake pune

minute kroz četiri minute. Koncentracija $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{S. cerevisiae}$ i $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{E. coli}$ iznosila je $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Brzina aminoaciliranja izražena kroz broj radioaktivnih raspada u minuti (eng. *counts per minute, CPM*) direktno je proporcionalna količini radioaktivno obilježenog serina vezanog na tRNA^{Ser} u reakciji aminoaciliranja. Mjerenje aminoacilacijske aktivnosti napravljeno je radi provjere funkcionalnosti pročišćenih varijanti enzima SerRS, odnosno sposobnosti prepoznavanja tRNA^{Ser} . Nakon provedenih analiza utvrđeno je kako obje varijante enzima SerRS prepoznaju tRNA^{Ser} iz dvije domene života (bakterije i eukarioti), pri čemu veću aktivnost pokazuje varijanta SerRS-His. Brzina reakcije vezanja radioaktivnog serina na $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{S. cerevisiae}$ bila je 2,6 puta veća u slučaju SerRS-His enzima naspram SerRS. Isti trend ponovio se i u slučaju $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{E. coli}$ gdje je brzina aminoaciliranja bila oko 2,2 puta veća za SerRS-His (tablica 9. i slika 19.).

Tablica 9. Određivanje aminoacilacijske aktivnosti SerRS i SerRS-His ($c = 5 \text{ nmol dm}^{-3}$) uz tRNA^{Ser} ($c = 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) iz bakterije *E. coli* i kvasca *S. cerevisiae* kao supstrat.

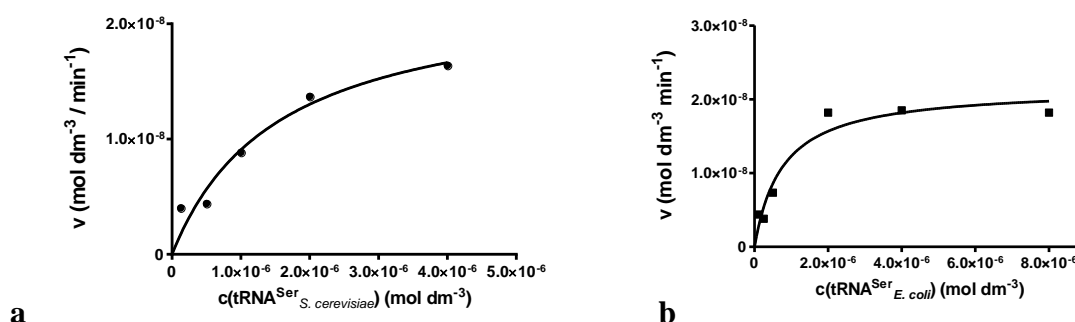
Supstrat		
$\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{S. cerevisiae}$	$\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{E. coli}$	
Brzina reakcije (CPM)		
135,7	78,73	SerRS-His
51,45	34,83	SerRS



Slika 19. Ovisnost promjene CPM u vremenu prilikom određivanja aminoacilacijske aktivnosti SerRS i SerRS-His ($c = 5 \text{ nmol dm}^{-3}$) uz tRNA^{Ser} ($c = 1 \mu\text{mol dm}^{-3}$) iz bakterije *E. coli* i kvasca *S. cerevisiae* kao supstrat. NK: negativna kontrola (reakcijska smjesa bez dodane tRNA^{Ser}).

4.1.2. Određivanje kinetičkih parametara

S obzirom da SerRS iz biljke *A. thaliana* uspješno aminoacilira bakterijsku i eukariotsku tRNA, a u nedostatku biljne homologne tRNA, Michaelisova konstanta (K_M) i maksimalna brzina (V_m) određene su korištenjem ukupne tRNA_{*S. cerevisiae*} ($w(tRNA^{Ser}) = 0,66\%$), odnosno ukupne tRNA_{*E. coli*} ($w(tRNA^{Ser}) = 4,1\%$). U slučaju tRNA_{*S. cerevisiae*}^{Ser} prosječna vrijednost K_M iznosila je $0,937 (\pm 0,390) \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je prosječna vrijednost V_m iznosila $0,020 (\pm 0,003) \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$. Iz ovih vrijednosti izračunata je vrijednost obrtnog broja k_{cat} i on je iznosio $0,13 (\pm 0,02) \text{ s}^{-1}$. U slučaju tRNA_{*E. coli*}^{Ser} prosječna vrijednost K_M je iznosila $0,759 (\pm 0,257) \mu\text{mol dm}^{-3}$, dok je prosječna vrijednost V_m iznosila $0,021 (\pm 0,002) \mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$. Obrtni broj je iznosio $0,14 (\pm 0,01) \text{ s}^{-1}$. Omjer k_{cat} / K_M je iznosio u slučaju tRNA_{*S. cerevisiae*}^{Ser} $0,13 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$, odnosno u slučaju tRNA_{*E. coli*}^{Ser} $0,18 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$ (slika 20. i tablica 10.). Uzimajući u obzir navedene vrijednosti kinetičkih parametara moguće je zaključiti kako citosolna varijanta SerRS enzima iz biljke *A. thaliana* gotovo jednako efikasno prepoznaje tRNA^{Ser} supstrate bakterijskog i eukariotskog podrijetla (što je ranije viđeno i kod kukuruzne citosolne varijante SerRS).



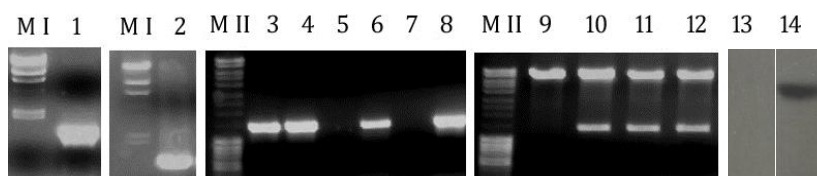
Slika 20. Michaelis-Menten grafički prikaz ovisnosti promjene brzine aminoacilacije uz SerRS-His protein ($c = 2,5 \text{ nmol dm}^{-3}$) s obzirom na tRNA^{Ser} iz *E. coli* (a) i *S. cerevisiae* (b) kao supstrat.

Tablica 10. Vrijednosti kinetičkih parametara K_M , V_m i k_{cat} određenih iz grafičkog prikaza (slika 20.).

	$K_M (\mu\text{mol dm}^{-3})$	$V_m (\mu\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1})$	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	k_{cat} / K_M ($\text{s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$)
tRNA _{<i>S. cerevisiae</i>}	$0,937 (\pm 0,390)$	$0,020 (\pm 0,003)$	$0,13 (\pm 0,02)$	0,13
tRNA _{<i>E. coli</i>}	$0,759 (\pm 0,257)$	$0,021 (\pm 0,002)$	$0,14 (\pm 0,01)$	0,18

4.2. Identifikacija proteinskih interaktora SerRS metodom Y2H

U svrhu identifikacije proteinskih interaktora SerRS primjenjena je metodologija kvašćevog sustava dvaju hibrida kako je ranije opisano u poglavlju 3.4.1. Materijali i metode. Prvotno je pripremljen fuzijski protein SerRS-GAL4-DNA BD na način da je nukleotidni kodirajući slijed koji kodira za SerRS umnožen u lančanoj reakciji *Pfu* DNA-polimeraze i ubačen u vektor pGBKT7 između restrikcijskih mjesta *NcoI* i *BamHI* tako da se GAL4-DNA-vezna domena (eng. *GAL4 DNA binding domain*) fuzionira na početak kodirajućeg slijeda za SerRS. Ovako pripremljen rekombinantni vektor korišten je za transformaciju stanica bakterije *E. coli* DH5 α , te je kasnije na odabranim bakterijskim kolonijama proveden kolonijski PCR, odnosno izolacija plazmidne DNA, te sekvenciranje i restrikcijska analiza (*NcoI* i *BamHI*) čime je potvrđena uspješnost kloniranja (slika 21.). Rekombinantni vektor pGBKT7 s ubačenim kodirajućim slijedom za SerRS korišten je za transformaciju stanica kvasca *S. cerevisiae* soja Y187. Ekspresija fuzijskog proteina u transformiranim stanicama kvasca potvrđena je *western-hibridizacijskom* analizom korištenjem mišjih monoklonskih antitijela na GAL4-DNA-veznu domenu, dok u stanicama kvasca koje su sadržavale prazni vektor pGBKT7 nije nađen pozitivan signal (slika 21., linije 13. i 14.).

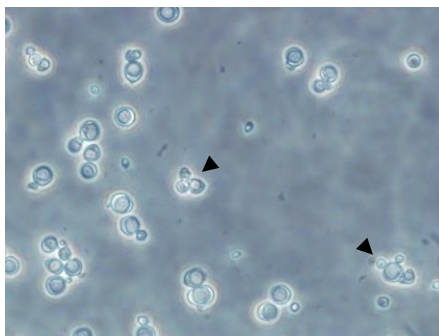


Slika 21. Prikaz uzoraka DNA na 1 % (w/v) gelu agaroze. MI: λ DNA razgrađena s restrikcijskom endonukleazom *HindIII*; linija 1: produkt PCR-a za SerRS-GAL4-DNA BD s *Taq* DNA-polimerazom; linija 2: produkt PCR-a za SerRS-GAL4-DNA BD s *Pfu* DNA polimerazom; MII: *MassRuler DNA Ladder Mix*; linije 3 – 7: rezultati kolonijskog PCR-a nakon ligacije plazmida pGBKT7 s kodirajućim slijedom za SerRS i transformacije u bakteriju *E. coli* DH5 α ; linija 9: plazmid pGBKT7 bez inserta; linije 10 - 12 rezultati kontrolne restrikcijske razgradnje plazmida pGBKT7 s *NcoI* i *BamHI* radi potvrđivanja uspješnog kloniranja kodirajućeg slijeda za SerRS-GAL4-DNA BD; *western-hibridizacijska* analiza proteinskog ekstrakta kvasca *S. cerevisiae* radi potvrde ekspresije SerRS-GAL4 DNA BD u stanicama kvasca; linija 13: stanice kvasca s pGBKT7 plazmidom bez inserta i linija 14: stanice kvasca s pGBKT7 plazmidom u kojemu je gen za SerRS.

Pretraga je napravljena dva puta pri čemu je u svakoj pretrazi korištena druga vrsta knjižnica cDNA koje su pripremljene na temelju mRNA izoliranih iz kljanaca biljke *A. thaliana*, a dobivene su ljubaznošću prof. Wolfganga Werra i dr. sc. Pascala Reisewitza. U prvoj pretrazi

upotrijebljena je knjižnica cDNA dobivena korištenjem nasumičnih početnica (eng. *random primed*), a u drugoj pretrazi knjižnica cDNA dobivena korištenjem oligo dT početnica. Nakon određivanja titra knjižnice cDNA (broja cDNA klonova u 1 mL) u soju AH109, analize broja stanica na hemocitometru za uzorke stanica kvasca koje su sadržavale SerRS kao mamac (Y187) i konačno određivanja titra stanica nakon sparivanja haploidnih stanica sojeva AH109 i Y187, određena je količina svih vrsta stanica u pretrazi (stanica s proteinom mamcom, stanica s proteinima plijenovima i diploidnih stanica nakon sparivanja (slika 22.)), kao i efikasnost sparivanja. Da bi se pretraga mogla smatrati optimalnom u reakciju mora ući više od 2×10^7 stanica knjižnice cDNA, više od 1×10^8 stanica soja koji sadržava mamac, odnosno mora biti pretraženo više od 5×10^6 stanica diploida (efikasnost sparivanja mora biti 2 % ili više). U ovom radu, u prvoj pretrazi utvrđena je prisutnost 7×10^7 stanica *random primed* knjižnice cDNA, $5,6 \times 10^8$ stanica soja Y187, dok je efikasnost sparivanja iznosila 0,5 % ($7,2 \times 10^5$ stanica diploida). U drugoj pretrazi utvrđena je prisutnost $3,6 \times 10^7$ stanica oligo dT knjižnice cDNA, 6×10^8 stanica soja Y187, dok je efikasnost sparivanja iznosila 0,32 % ($3,45 \times 10^5$ stanica diploida). Iako je broj stanica diploida u obje pretrage bio niži od preporučenog, ovo je smatrano zadovoljavajućim, te je nastavljeno s Y2H pretragama. Nastale diploidne stanice su dalje nasadene na krute hranjive podloge niske selektivnosti (-Leu / -Trp) i inkubirane. S obzirom da je u obje pretrage broj naraslih kvašćevih kolonija na ovim podlogama bio izrazito velik (preko 200), za daljnju analizu uzimane su samo one kolonije čiji je promjer bio jednak ili veći od 1 mm (takvih je u prvoj pretrazi bilo 43, odnosno u drugoj 200). Na podlogama umjerene selektivnosti (-Leu / -Trp / -His i -Leu / -Trp / -Ade) u prvoj pretrazi od 43 kolonije presađene s podloga niske selektivnosti nastavilo je rast 13 kolonija. Iste kolonije su nastavile rast i nakon presađivanja na podloge visoke selektivnosti (-Leu / -Trp / -His / -Ade). S obzirom da je moguće da ista stanica ponekad posjeduje više od jednog plazmida s različitim insertima cDNA, te da samo jedan od plazmida zaista sadrži fragment cDNA koji kodira za protein plijen, potrebno je ukloniti nepotrebne plazmide koji bi mogli biti identificirani kao lažni pozitivni. Ovo se uobičajeno postiže uzastopnim presađivanjem diploidnih stanica kvasaca s jedne nisko selektivne podloge na drugu tako da se dobiju pojedinačne kolonije, a uslijed čega stanica odbacuje plazmide koji joj nisu nužno potrebni. Konačno, prije same izolacije plazmidne DNA, potencijalno pozitivne kolonije nasadene su preko noći u -Leu tekućem hranjivom mediju čime je omogućeno dobivanje stanica kvasaca koje sadrže samo plazmide pGADT7 koji kodiraju za

proteine plijenove, dok bi se plazmidi pGBKT7 trebali odbaciti. Nakon što je ovaj proces proveden na 13 potencijalno pozitivnih kolonija, napravljena je izolacija plazmidne DNA, sekvenciranje i BLAST analiza, te su identificirani potencijalni interaktori SerRS.



Slika 22. Izgled stanica kvasca *S. cerevisiae* nakon sparivanja haploidnih sojeva pod mikroskopom (povećanje 20 ×). Karakteristične formacije diploidnih zigota označene su strelicama.

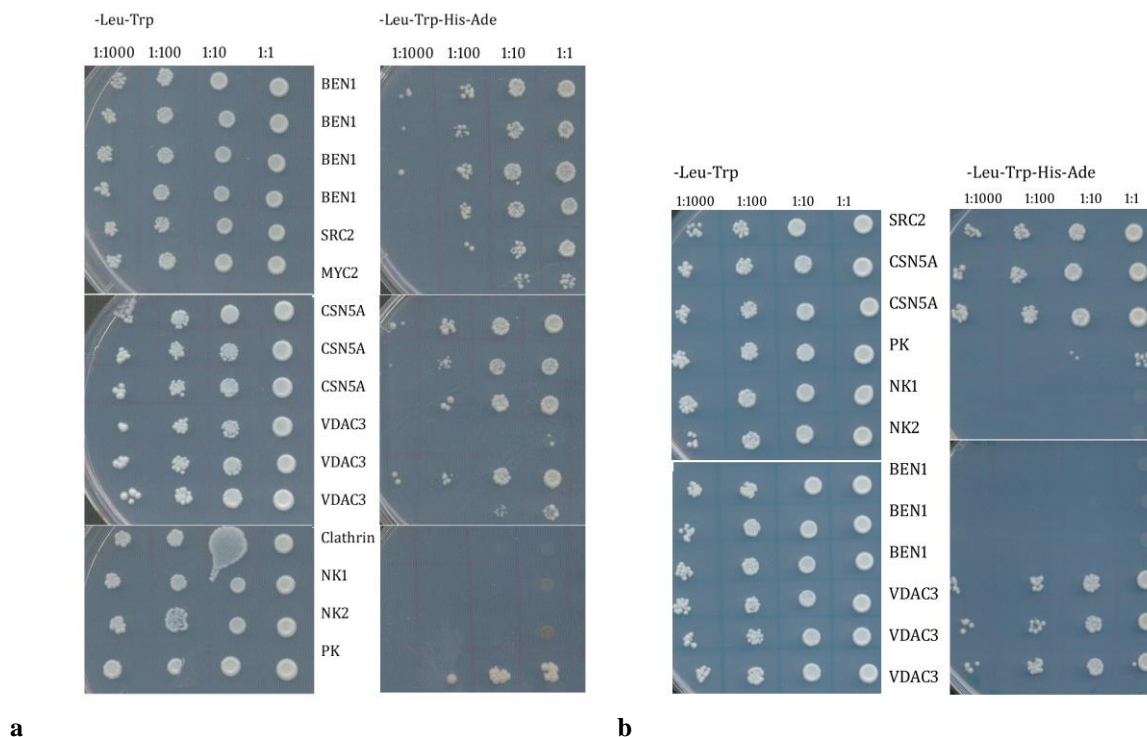
U drugoj pretrazi 200 potencijalno pozitivnih kolonija nasađeno je direktno s podloga niske selektivnosti na podloge visoke selektivnosti gdje su sve neočekivano nastavile rast, iako je većina pokazala promjenu fenotipa u smislu promjene boje kolonije iz bijele u crvenu (odraz nedostatka adenina u stanici). S obzirom da je naknadno pokazano kako na istim podlogama rastu i kolonije kvasaca korištene kao negativne kontrole, napravljen je X-gal filter test čiji ishod ne ovisi o selektivnosti podloga čime je od 200 početnih kolonija selektirano njih 71 koje su pokazale plavljenje, odnosno aktivaciju gena izvjestitelja *lacZ* koji kodira za enzim β -galaktozidazu. Naknadnim uzastopnim presađivanjem ovih kolonija na podloge niske selektivnosti radi uklanjanja eventualnih suvišnih plazmida u diploidnim stanicama došlo je do iznenađujućeg smanjivanja broja potencijalno pozitivnih kolonija sa 71 na 3. Jedan od uzroka ovakvog smanjenja moglo bi biti kvaščevo neselektivno odbacivanje plazmida s kodirajućim slijedovima esencijalnim za interakciju uslijed uzastopnog presađivanja na podlogama niske selektivnosti, što dokida interakciju i posljedično aktivaciju gena izvjestitelja. Konačno, iz sve 3 kolonije na jednak način kao u prvoj pretrazi izolirana je plazmidna DNA koja je podvrgnuta restriksijskoj analizi s restriksijskom endonukleazom *HindIII* radi potvrđivanja identiteta plazmida (pGADT7), odnosno provjere sadrži li plazmid insert. Od tri uzorka plazmidne DNA samo je jedan pokazao prisutnost inserta, te je jedini na kojemu su nastavljene daljne analize (rezultati nisu pokazani).

Tablica 11. Pregled potencijalnih proteinskih interaktora citosolne SerRS iz biljke *A. thaliana* detektiranih kvašćevim sustavom dvaju hibrida nakon prvog kruga.

TAIR oznaka	Naziv proteina	Broj detektiranih klonova	Funkcijski značaj
AT2G45400.1	BEN1	4	Uključenost u metabolizam i biosintezu brasinosteroida, te biosintezu sterola.
AT5G15090.1	VDAC3 (eng. <i>voltage dependent anion channel</i>)	3	Uključenost u aerobnu respiraciju, anionski transmembranski transport, biljni obrambeni odgovor na bakterijsku infekciju, hladnoću i citokine, regulaciju klijanja sjemena.
AT1G22920.1	CSN5A (COP9 signalosome complex subunit 5a)	3	Uključenost u sastavljanje COP9 signalosoma, kulinsku posttranslacijsku modifikaciju (micanjem proteina NEDD8), negativnu regulaciju fotomorfogeneze, fototransdukciju, pozitivnu regulaciju G2/M tranzicije mitoze, odgovora biljke na auksine.
AT1G09070.1	Src2 protein	1	Uključenost u transport i usmjeravanje makromolekula i njihovnih građevnih komponenti u stanici, negativnu regulaciju programirane stanične smrti, odgovor na nedovoljno osvjetljenje, mehaničke podražaje i ranjavanje biljke.
AT1G32640.1	Myc2	1	Uključenost u signalne puteve moderirane jasmonskom, salicilnom i abscizinskom kiselinom, biosintezu i metabolizam jasmonske kiseline, negativnu regulaciju programirane smrti stanice, pozitivnu regulaciju biosinteze flavonoida, transkripciju.
AT1G10730.1	(eng. <i>Clathrin adaptor complex subunit family protein</i>)	1	Uključenost u unutarstanični transport proteina i proteinsku glikozilaciju.

Svaki potencijalni interaktor podvrgnut je ponovnom testu interakcije sa SerRS (kvasci soja AH109 podvrgnuti su dvostrukoj transformaciji s plazmidom pGBKT7 koji sadrži cDNA za SerRS i plazmidom pGADT7 koji sadrži cDNA za potencijalni interaktor), odnosno samostalnoj sposobnosti aktivacije gena izvjestitelja bez prisustva SerRS (kvasci soja AH109 transformirani su samo s plazmidom pGADT7 koji sadrži gen za potencijalni interaktor). Pripremljena serijska razrijeđenja otopina stanica transformiranih kvasca (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) nanešena su na nisko i visoko selektivne podloge, te je rast potvrđen za sve potencijalne interaktore, osim za *Clathrin adaptor complex subunit family protein* (slika 23. a). Međutim, autoaktivacijsko djelovanje primjećeno je kod svih potencijalnih interaktora (slika 23. b), osim za protein BEN1 što je bila *in vivo* potvrda interakcije BEN1 i SerRS.

Protein BEN1 je enzim iz skupine oksido-reduktaza (glavninu proteina čini regija homologna NAD(P)-veznoj domeni; slika 24.), a sudjeluje u metabolizmu i biosintezi brasinosteroida i sterola (bilo direktno preko razgradnje brasinosteroidnih hormona ili posredno preko regulacije biosinteze flavonoida, s obzirom da je protein BEN1 najbliži paralog dihidroflavonol-4-reduktaze i antocijanin-reduktaze, enzima uključenih u biosintezu flavonoida¹²⁸). N-kraj proteina BEN1 obiluje kiselim aminokiselinama i (kako će kasnije biti objašnjeno) odgovoran je za uspostavu interakcije s proteinom SerRS.



Slika 23. a: provjera interakcije odabranih proteinskih interaktora citosolne SerRS iz *A. thaliana* na hranjivim medijima niske (-Leu-Trp) i visoke (-Leu-Trp-His-Ade) selektivnosti u decimalnim razrijeđenjima. Stanice kvasca *S. cerevisiae* soja AH109 podvrgnute su dvostrukoj transformaciji s plazmidnim vektorima pGADT7 (s cDNA za potencijalni interaktor) i pGBKT7 (s cDNA za SerRS). **b:** provjera autoaktivacije gena izvjestitelja od strane odabranih potencijalnih proteinskih interaktora. Stanice kvasca *S. cerevisiae* soja AH109 transformirane su s plazmidnim vektorom pGADT7 koji sadrži cDNA za potencijalni proteinski interaktor i nasadene na hranjive medije niske i visoke selektivnosti.

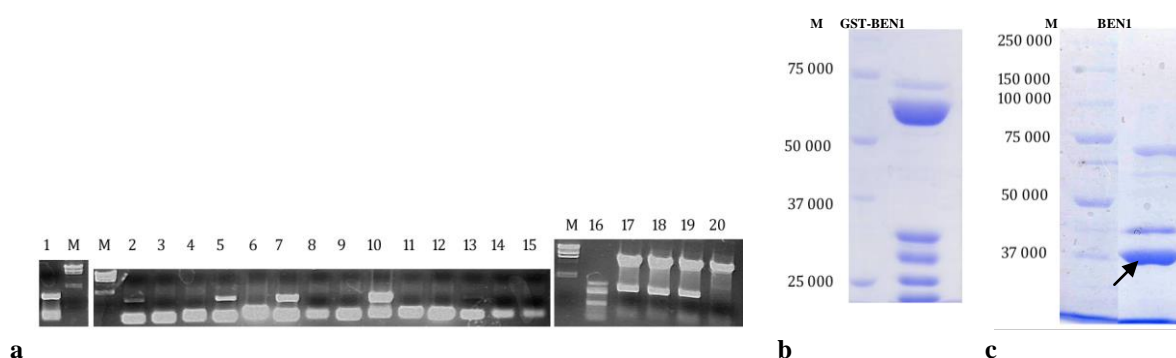
MVREEQEEDD NNNNNNGGGE RKLLVADETV PSLLEDGTLV CVTGGSGFVA
 SWLIMRLLQR GYSVRATVRT NSEGNKKDIS YLTELPPHASE RLQIFTADLN
 EPESFKPAIE GCKAVFHVHVAH PMDPNSNETE ETVTKRTVQG LMGILKSCLD
 AKTVKRFFYT SSAVTVFYSG GNGGGGGEVD ESVWSDVEVF RNQKEKRVSS
 SYVSKMAAE TAALEFGGKN GLEVVTLVIP LVVGPFISS LPSSVFISLA
 MLFGNYKEY LFDTYNMVHI DDVARAMIFL LEKPVAKGRY ICSSVEMKID
 EVFEFLSTKF PQFQLPSIDL NKYKVEKRMG LSSKKLKSAG FEFKYGAEEI
 FSGAIRSCQA RGFL

Slika 24. Aminokiselinski slijed proteina BEN1. Crveno je označena regija homologna NAD(P)-veznoj domeni, dok su deblje otisnute hidrofilne aminokiseline na N-kraju proteina (kako će kasnije biti objašnjeno, N-kraj proteina BEN1 odgovoran je za uspostavu interakcije s proteinom SerRS).

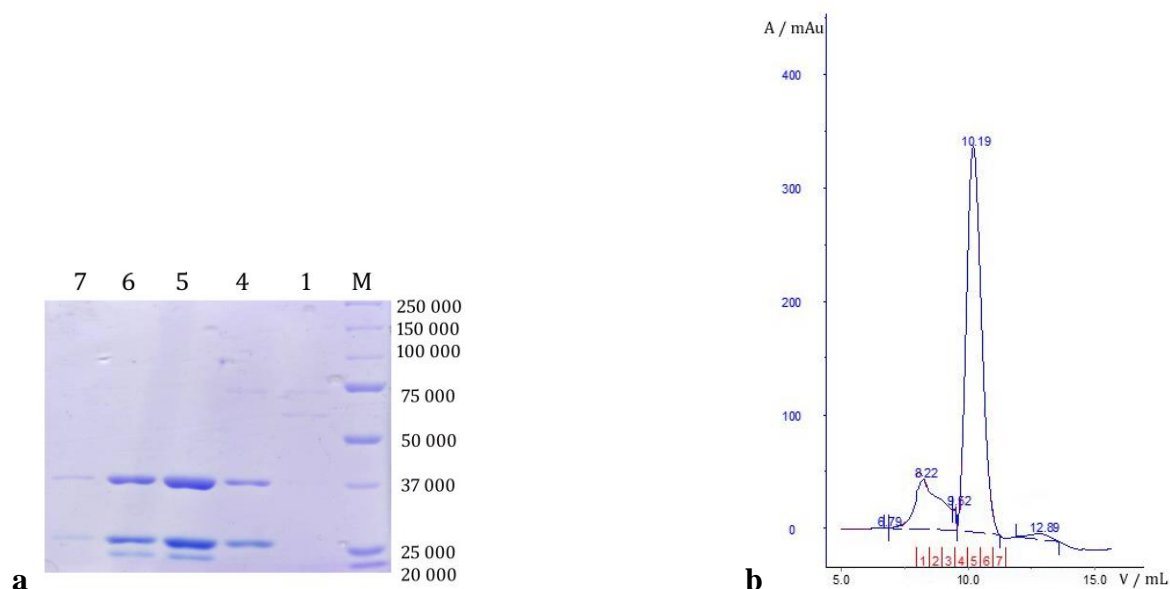
4.3. Biofizička analiza interakcije SerRS i BEN1

Biofizičkim mjerenjima potvrđena je interakcija BEN1:SerRS *in vitro*. U tu svrhu pripremljene su dvije varijante proteina BEN1: BEN1 s GST-privjeskom, odnosno na N-kraju proteina. Nukleotidni slijed koji kodira za protein BEN1 dobiven je lančanom reakcijom *Pfu* DNA-polimeraze na cDNA dobivenom reakcijom reverzne transkripcije izolata ukupne mRNA iz biljke *A. thaliana*. Za dobivanje proteina GST-BEN1 ovaj slijed je ubačen u plazmidni vektor pGEX-6P-1, odnosno za dobivanje proteina His-BEN1 u plazmidni vektor pPROEX Htb. U oba slučaja korištena su restrikcijska mjesta *Bam*HI i *Xho*I. Uspješnost kloniranja potvrđena je kolonijskim PCR-om, odnosno restrikcijskom analizom (*Bam*HI i *Xho*I) odabranih pozitivnih bakterijskih kolonija, te sekvenciranjem plazmidne DNA (GST-BEN1: slika 25. a; His-BEN1: slika 27. a). Rekombinantni plazmidi korišteni su za transformaciju stanica bakterije *E. coli* BL21 (DE3), a optimalna ekspresija postignuta je indukcijom IPTG-om koncentracije 0,5 mmol dm⁻³ kroz 12 sati na 15 °C. GST-BEN1 (M_r (BEN1) = 40 260; M_r (GST-BEN1) = 64 390) nakon afinitetne kromatografije na GST-agarozu, u analizi SDS-PAGE pokazuje specifičan degradacijski "otisak" od 4 vrpce malih relativnih molekulskih masa koji djelomično nestaje nakon što se proteinu proteolitički odcijepi i propuštanjem kroz GST-agarozu ukloni GST-privjesak (slika 25. b i c). Za biofizičke analize korišten je isključivo protein BEN1 bez privjeska koji je dodatno pročišćavan gel-filtracijskom kromatografijom, i dok je ovakvim pristupom postignuto uspješno uklanjanje onečišćenja velikih relativnih molekulskih masa, nije bilo moguće u potpunosti maknuti onečišćenja malih relativnih molekulskih masa (slika 26. a). Protein His-BEN1 pročišćen je afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu.

Kao što je vidljivo (slika 27. b) nakon analize kromatografskih frakcija u SDS-PAGE metodi i protein His-BEN1, baš kao i protein GST-BEN1 pokazuje karakteristične kontaminacijske vrpce viših, odnosno nižih relativnih molekulskih masa. Ipak, za razliku od GST-BEN1, kod His-BEN1 bilo je moguće nakon proteolitičkog odcjepljivanja (His)₆ i gel-filtracije dobiti frakcije proteina BEN1 bez privjeska relativno visoke čistoće. Na slici 27. d prikazan je SDS-poliakrilamidni gel nakon elektroforeze na koji su bili nanijeti uzorci elucijskih frakcija nakon proteolitičkog rezanja His-BEN1 proteazom *TeV* i anionsko-izmjenjivačke kromatografije na koloni *MonoQ*. Moguće je zaključiti kako efikasnost proteolitičkog cijepanja nije bila

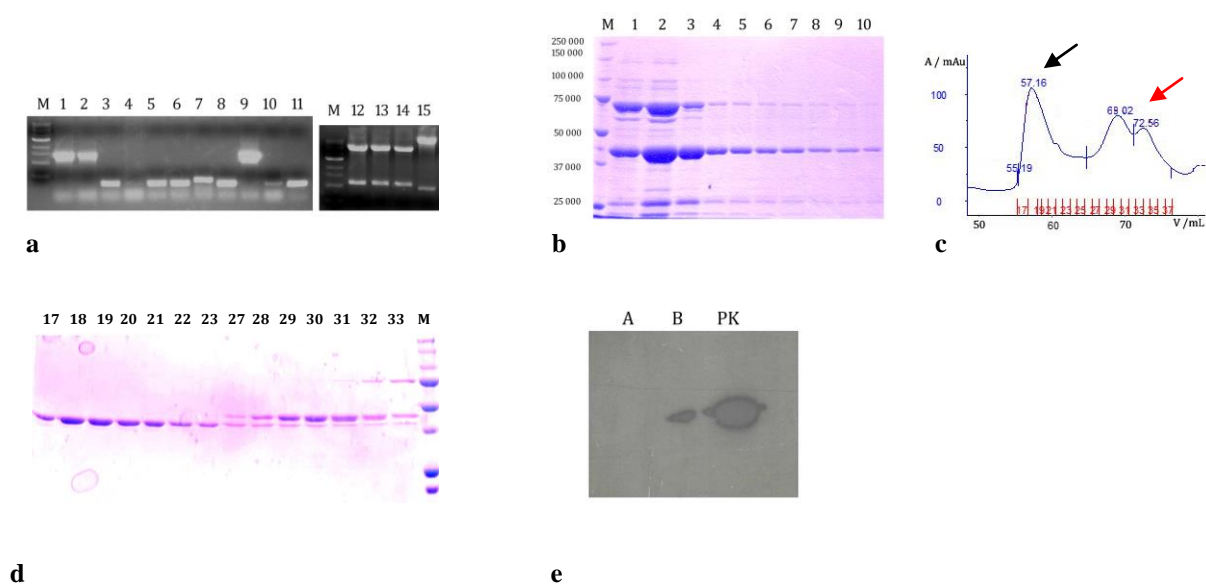


Slika 25. M: λ DNA razgrađena s restrikcijskom endonukleazom *HindIII*. **a:** linija 1: rezultat PCR reakcije s *Pfu* DNA-polimerazom za cDNA koji kodira protein BEN1; linije 2 – 15: rezultati kolonijskog PCR-a za konstrukt GST-BEN1; 16.- 100 bp DNA Ladder; 17.-20. rezultati restrikcijske analize *BamHI* / *XhoI* radi potvrde uspješnosti kloniranja cDNA za BEN1 u pGEX-6P1 vektor. **b:** ekspresijski profil proteina GST-BEN1 na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu gdje su uz intenzivnu vrpcu na razini $M_r \approx 64\,000$ koja odgovara fuzijskom proteinu GST-BEN1 ($M_r = 64\,390$) vidljive i četiri vrpce znatno manje relativne molekulske mase koje vjerojatno odgovaraju degradacijskim produktima GST-BEN1. **c:** protein BEN1 analiziran na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu nakon proteolitičkog tretmana s *Prescission protease* (GE Healthcare) i afinitetne kromatografije na GST-agarozu, vidljiva je intenzivna vrpca koja odgovara $M_r \approx 40\,000$ (M_r BEN1 bez privjeska = 40 260) - označena strelicom, dok su degradacijske vrpce djelomično nestale.



Slika 26. a: analiza elucijskih frakcija nakon gel-filtracije (kromatografska kolona *Superdex 75*) na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu za protein BEN1 kojemu je prethodno proteolitički uklonjen GST-privjesak. **b:** kromatogram za gel-filtraciju proteina BEN1 bez privjeska.

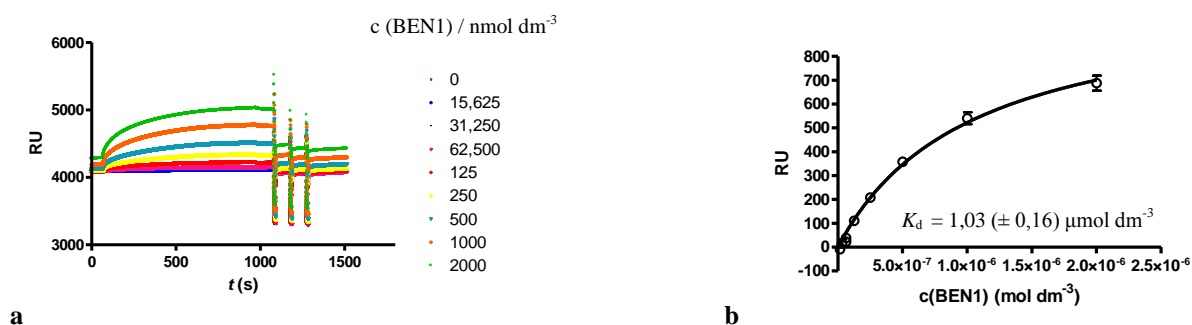
maksimalna, no svejedno se jasno razlučuju frakcije u kojima još uvijek postoji smjesa proteina His-BEN1 i BEN1, odnosno frakcije u kojima se nalazi isključivo protein BEN1 bez privjeska. Spajanjem i ukoncentriravanjem frakcija 27-29 koje sadrže smjesu proteina s privjeskom i proteina bez privjeska i frakcija 20-23 koje sadrže protein bez privjeska *western-hibridizacijskom* analizom s mišjim monoklonskim anti-His antitijelima potvrđeno da frakcije proteina BEN1 zaista više ne sadrže (His)₆-privjesak (slika 28. e), te su one korištene u biofizičkim analizama.



Slika 27. a: M: 1 kb DNA Ladder; linije 1 – 11: produkti kolonijskog PCR-a za potvrđivanje uspješnosti kloniranja gena za BEN1 u plazmidni vektor pPROEX Htb na 1 % (w/v) agaroznom gelu; linije 12 – 15: rezultati restrikcijske razgradnje plazmidnog vektora pPROEX Htb nakon kloniranja s cDNA koja kodira za protein BEN1 na 1 % (w/v) agaroznom gelu. **b:** analiza elucijskih frakcija na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu nakon Ni-NTA afinitetne kromatografije proteina His-BEN1. **c:** kromatogram za anionsku izmjenu na kromatografskoj koloni *MonoQ* proteina BEN1 kojemu je prethodno proteolitički uklonjen (His)₆-privjesak. Iako je provedeno proteolitičko uklanjanje (His)₆-privjeska, na kromatogramu je vidljivo nekoliko vrškova od kojih ona pozicija označena crnom strelicom sadrži protein BEN1 bez privjeska što je ustanovljeno analizom frakcija elektroforezom na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu (slika **d**, linije 17 – 23). Pozicija označena crvenom strelicom zapravo je smjesa proteina BEN1 i His-BEN1 (**d** linije 27 - 33). **e:** *Western-hibridizacijska* analiza s anti-His antitijelima za frakcije nakon ionsko-izmjenjivačke kromatografije: A- spojene elucijske frakcije 20.-23., B- spojene elucijske frakcije 27.-29., PK- pozitivna kontrola.

4.3.1. Analiza interakcije BEN1:SerRS metodom rezonancije površinskih plazmona

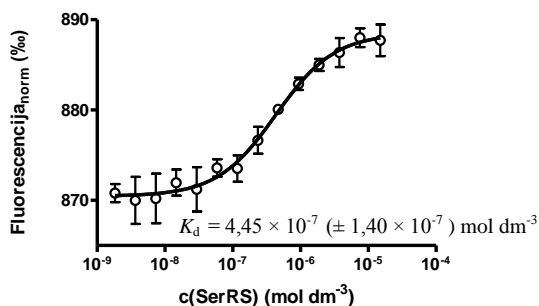
Budući da je u aminoacilacijskim testovima SerRS-His pokazivao veću aktivnost od SerRS, za SPR je korištena varijanta proteina s (His)₆-privjesakom na C-kraju. Također, za preliminarna mjerenja korišten je protein BEN1 kojemu je proteolitički uklonjen GST-privjesak, no budući da su ove proteinske frakcije još uvijek sadržavale kontaminacije malih molekulskih masa, za određivanje konstante disocijacije kompleksa korišten je protein BEN1 kojemu je proteolitički uklonjen (His)₆-privjesak. Primarno je korišten Ni-NTA čip s imobiliziranim SerRS-His, dok je mobilna faza sadržavala protein BEN1. Neočekivani problem ovakvog pristupa očitovao se u izrazitom nespecifičnom vezanju proteina BEN1 na površinu referentne ćelije čipa, na kojoj nije bio imobiliziran SerRS-His, a koja inače služi za određivanje rezonantnog signala nespecifičnog vezanja eluensa, kako bi se isti mogao oduzeti od signala ćelije na kojoj je imobiliziran ispitivani protein i na kojoj dolazi do interakcije. S obzirom da je nespecifično vezanje BEN1 na površinu referentne ćelije bilo veće od vezanja na SerRS-His nije bilo moguće odrediti konstantu disocijacije kompleksa BEN1:SerRS. Kako je jedan od mogućih uzroka ovako intenzivnog nespecifičnog vezanja proteina BEN1 na površinu referentne ćelije zaostajanje (His)₆-privjeska na proteinu BEN1 koje nije bilo moguće vidjeti *western-hibridizacijskom* analizom (eventualno zbog smanjenje osjetljivosti antitijela), problem je riješen zamjenom Ni-NTA čipa sa CM5 čipom na kojemu su proteini vezani kovalentno, a ne preko nekovalentnih interakcija atoma nikla i histidinskih ostataka kao što je to slučaj kod Ni-NTA čipa. S obzirom da je ovdje u slučaju kada je BEN1 bio imobiliziran na površinu čipa, SerRS-His pokazivao jednako ponašanje na referentnoj ćeliji kao i BEN1 u slučaju Ni-NTA čipa, titracijski eksperimenti za određivanje konstante disocijacije rađeni su na način da je na površinu čipa bio vezan SerRS-His (RU = 1350), a u mobilnoj fazi je propuštan BEN1 protein u serijskim razrijeđenjima (15,62 nmol dm⁻³; 32,25 nmol dm⁻³; 62,5 nmol dm⁻³; 125 nmol dm⁻³; 250 nmol dm⁻³; 500 nmol dm⁻³; 1000 nmol dm⁻³ i 2000 nmol dm⁻³). Korišten je HBS pufer sa i bez dodanog MgCl₂ (do konačne koncentracije od 5 mmol dm⁻³). Interakcija između SerRS-His i BEN1 proteina zamijećena je samo u slučaju korištenja HBS pufera s dodanim 5 mmol dm⁻³ magnezijevim kloridom. Nakon tri uzastopne titracije određena konstanta disocijacije kompleksa K_d BEN1:SerRS iznosila je $1,03 \times 10^{-6} (\pm 1,67 \times 10^{-7})$ mol dm⁻³.



Slika 28. Senzorgram titracije proteina SerRS-His vezanog na CM5 čip proteinom BEN1 bez privjeska (a) i prikaz promjene optičkog odziva u ovisnosti o koncentraciji proteina BEN1 u mobilnoj fazi u SPR metodi (b).

4.3.2. Analiza interakcije BEN1:SerRS mikrotermoforezom

Metodom mikrotermoforeze dodatno je *in vitro* potvrđena interakcija SerRS-His, odnosno SerRS bez privjeska i proteina BEN1, također bez privjeska. U mjerenjima gdje je korišten SerRS-His dolazilo je značajne agregacije proteina u kapilarama, što je tek djelomično ublaženo dodatkom deterdženta (*Tween*, 0,05 % (v/v)) u pufer istog sastava kao i u SPR mjerenjima, te je u daljnjim mjerenjima korišten SerRS bez privjeska. Provedena su tri uzastopna mikrotermoforetska mjerenja na način da je koncentracija fluorescento obilježene molekule (BEN1) održavana stalnom (tako da vrijednost odziva fluorescencije bude unutar raspona vrijednosti od 200 do 1500 jedinica), dok je SerRS pripremljen u decimalnim razrijeđenjima (16 razrijeđenja, početna koncentracija $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$). Određena je vrijednost konstante disocijacije kompleksa SerRS:BEN1 i ona je iznosila $4,45 \times 10^{-7} (\pm 1,40 \times 10^{-7}) \text{mol dm}^{-3}$.

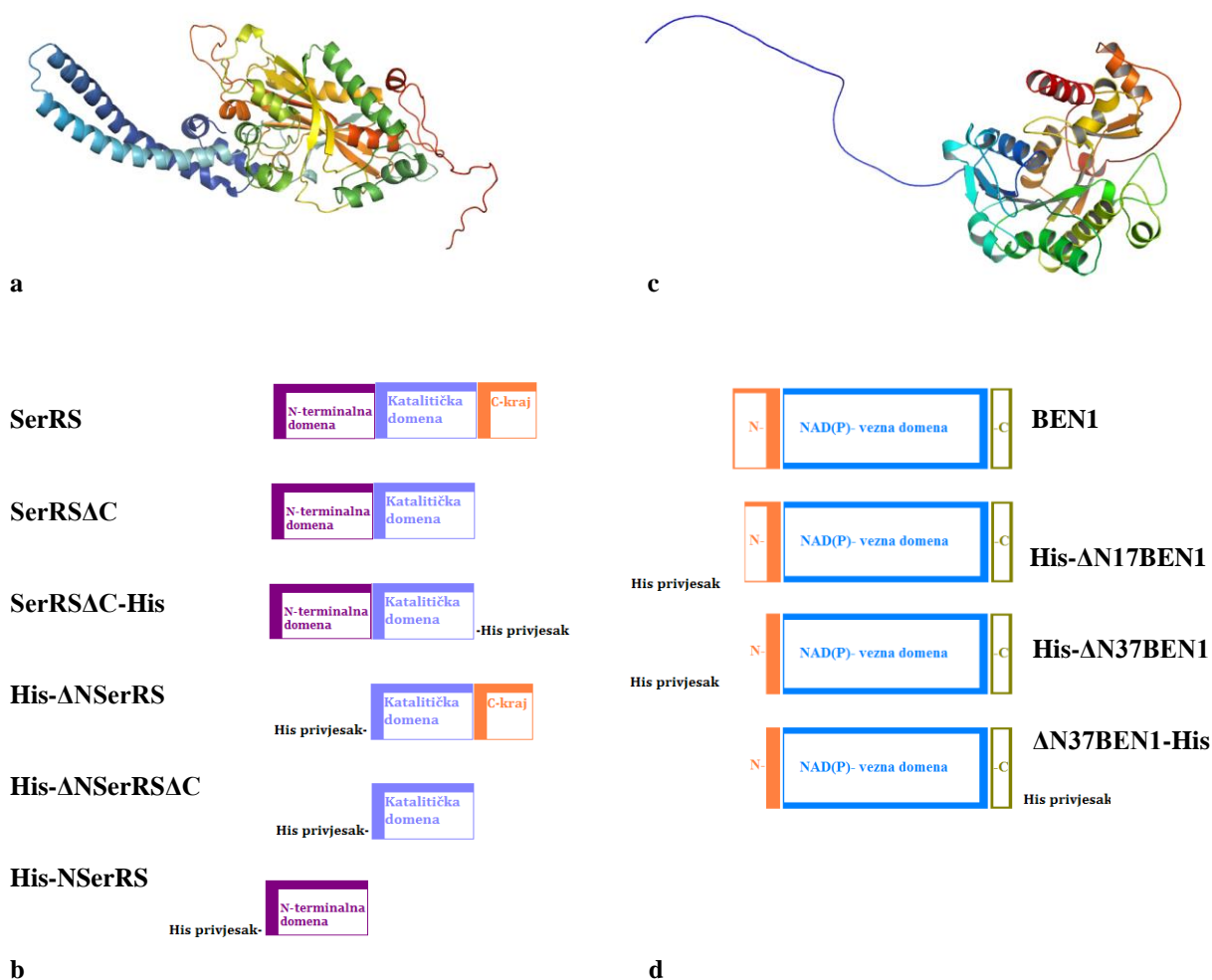


Slika 29. Mikrotermoforetsko dokazivanje proteinske interakcije između SerRS i proteina BEN1 označenog fluorescentnom bojom uz određivanje konstante disocijacije kompleksa.

4.3.3. Određivanje interakcijskih domena proteina BEN1 i SerRS u kompleksu BEN1:SerRS

U svrhu preciznog određivanja interakcijskih domena proteina BEN1 i SerRS pripremljene su skraćene verzije oba proteina, te su provedena biofizička mjerenja (mikrotermoforeza) kako bi se utvrdilo interakcijsko sučelje dvaju proteina. Budući da još uvijek nije riješena trodimenzionalna struktura citosolne SerRS iz biljke *A. thaliana*, kao niti proteina BEN1, uz pomoć internetskog servisa [(PS)²-v2]^{113,114} napravljene su predikcije trodimenzionalnih struktura cjelovitih proteina (slika 30.) na osnovu kojih su osmišljene skraćene varijante proteina.

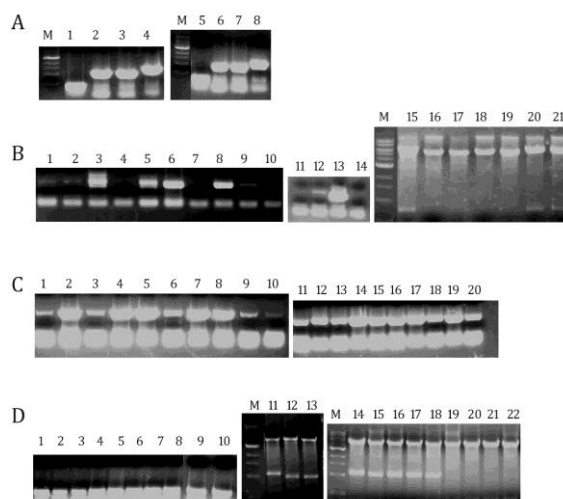
Pripremljene su dvije varijante proteina SerRS kojima nedostaje 9 aminokiselina na C-kraju (bazična hidrofilna regija). Lančanom reakcijom s *Pfu* DNA-polimerazom pripremljeni su nukleotidni sljedovi i potom ubačeni u pET28b plazmidni vektor između mjesta *NcoI* i *NotI* na način da je nukleotidni slijed nastao korištenjem para početnica SRSATN i ATCDCR (bez STOP kodona u povratnoj početnici) omogućio dobivanje skraćene varijante SerRS proteina s dodanim (His)₆-privjeskom na C-kraju (SerRSΔC-His), dok je nukleotidni slijed nastao korištenjem para početnica SRSATN i ATCKDR (sa STOP kodon u povratnoj početnici) omogućio dobivanje skraćene varijante SerRS proteina bez privjeska (SerRSΔC). Nadalje, pripremljeni su genski konstrukti za skraćenu varijantu SerRS kojoj nedostaje početnih 97 aminokiselina (N-terminalna domena), te joj je dodan (His)₆-privjesak na N-kraj (His-ΔNSerRS), odnosno skraćenu varijantu SerRS kojoj uz N-terminalnu domenu nedostaje i 9 krajnjih aminokiselina i također ima dodan (His)₆-privjesak na N-kraju (His-ΔNSerRSΔC). Nukleotidni sljedovi za His-ΔNSerRS i His-ΔNSerRSΔC dobiveni su lančanom reakcijom



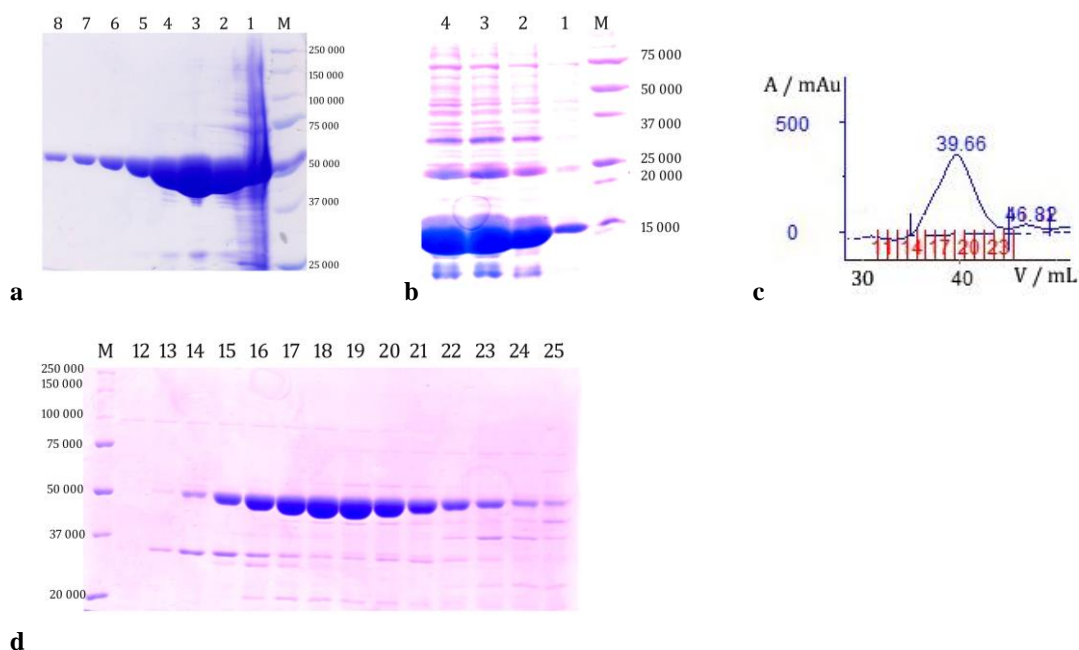
Slika 30. **a:** računalna predikcija trodimenzionalne strukture SerRS iz biljke *A. thaliana* napravljena programima $(PS)^2$ -v2 i *PyMol*. **b:** shematski prikaz funkcionalnih domena cjelovitog SerRS proteina i skraćenih varijanti koje su pripravljene u ovom radu (SerRS: cjeloviti SerRS protein, SerRSΔC: protein bez polarnog dijela C-kraja (9 krajnjih aminokiselina) i bez privjeska, SerRSΔC: protein bez polarnog dijela C-kraja i s $(His)_6$ -privjeskom na C-kraju, His-ΔNSerRS: protein bez N-terminalne domene (početnih 97 aminokiselina) i $(His)_6$ -privjeskom na N-kraju, His-ΔNSerRSΔC: protein bez N-terminalne domene i polarnog dijela C-kraja, te s dodanim $(His)_6$ -privjeskom na N-kraju proteina, His-NSerRS: samostalna N-terminalna domena SerRS. **c:** računalna predikcija trodimenzionalne strukture BEN1 iz biljke *A. thaliana* napravljena programima $(PS)^2$ -v2 i *PyMol*. **d:** shematski prikaz funkcionalnih domena cjelovitog BEN1 proteina i skraćenih varijanti koje su pripravljene u ovom radu (BEN1: cjeloviti protein, HisΔN17BEN1: protein bez prvih 17 aminokiselina na N-kraju s dodanim na N-kraj; His-ΔN37BEN1 i ΔN37BEN1-His: proteini bez prvih 37 aminokiselina na N-kraju s na N- ili C-kraju).

Pfu DNA-polimeraze i ubačeni u plazmidni vektor pPROEX Htb između mjesta *Bam*HI i *Not*I. Konačno, lančanom reakcijom *Pfu* DNA-polimeraze pripremljen je nukleotidni slijed

koji kodira samo za N-terminalnu domenu SerRS (prvih 97 aminokiselina, His-NSerRS), te je ubačen u plazmidni vektor pPROEX Htb između restrikcijskih mjesta *NcoI* i *NotI* kako bi se dobio rekombinantni protein s dodanim (His)₆-privjeskom na N-kraju. Svi rekombinantni plazmidi (za sve varijante skraćenog SerRS) podvrgnuti su sekvencijskoj i restrikcijskoj analizi (za varijante SerRSΔC-His i SerRSΔC restrikcijskom endonukleazom *HindIII* čijim rezanjem u slučaju uspješnog kloniranja nastaju dva fragmenta duljina 5 811 pb i 753 pb, dok su za varijante His-ΔNSerRS, His-ΔNSerRSΔC i His-NSerRS korišteni *NcoI* i *XbaI* koji režu pPROEX Htb tako da nastaje jedan dulji fragment ~ 5 200 pb, dok drugi ugrubo odgovara duljini kloniranog genskog slijeda, što za His-ΔNSerRS iznosi ~ 1 080 pb, za His-ΔNSerRSΔC iznosi ~1060 pb i za His-NSerRS iznosi ~ 300 pb) čime je potvrđena uspješnost kloniranja u svim slučajevima (slika 31.). Nakon transformacije stanica bakterije *E. coli* BL21(DE3) optimalna ekspresija za SerRSΔC-His i SerRSΔC postignuta je indukcijom 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-om kroz 12 sati na 15 °C. SerRSΔC-His pročišćen je nakon sonikacije bakterijskih stanica na Ni-NTA agarozu s relativno visokim prinosom topljivog proteina (slika 32. a), unatoč značajnom zaostajanju proteina u obliku inkluzijskih tijela. Frakcije SerRSΔC-His nisu dodatno pročišćavane, već su kao takve uzimane za daljnje biofizičke analize. SerRSΔC (pI = 5,04) pročišćen je na anionsko-izmjenjivačkoj koloni *MonoQ* u puferu pH = 8,0 (pri 4 °C) nakon čega su dobivene frakcije proteina relativno visoke čistoće koje nisu dodatno pročišćavane za daljnje biofizičke analize (slika 32. c i d).



Slika 31. Prikaz DNA uzoraka na 1 % (w/v) gelu agaroze nakon PCR-a s *Taq* i *Pfu* DNA-polimerazom, produkata kolonijskog PCR-a i restrikcijskih analiza za potvrđivanje uspješnosti ugradnje kodirajućeg slijeda za skraćene varijante SerRS. M- 1 kb DNA Ladder. **A:** produkti PCR-a *Taq* DNA-polimerazom za varijante SerRSΔC-His (linija 4), His-ΔNSerRS (3.) His-ΔNSerRSΔC (linija 2) His-NSerRS (linija 1), odnosno *Pfu* DNA-polimerazom SerRSΔC-His (linija 8), His-ΔNSerRS (linija 7), His-ΔNSerRSΔC (linija 6) i His-NSerRS (linija 5). **B:** linije 1-10: rezultati kolonijskog PCR-a reakcije za SerRSΔC-His, odnosno linije 11-14 za SerRSΔC; linije 15-20: rezultati restrikcijske analize s *HindIII* restrikcijskom endonukleazom za SerRSΔC-His i linija 21 za SerRSΔC. **C:** linije 1-10: rezultati kolonijskog PCR-a za His-ΔNSerRS, odnosno linije 11-20 za His-ΔNSerRSΔC. **D:** linije 1-10: rezultati kolonijskog PCR-a za His-NSerRS; linije 11-13: rezultati restrikcijske razgradnje za His-ΔNSerRS, odnosno linije 15-18 za His-ΔNSerRSΔC i linije 19-22 za His-NSerRS.



Slika 32. Analiza eluiranih frakcija nakon Ni-NTA afinitetne kromatografije na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu za SerRSΔC-His (a), odnosno 12 % SDS-poliakrilamidnom gelu za proteinsku varijantu His-NSerRS (b).

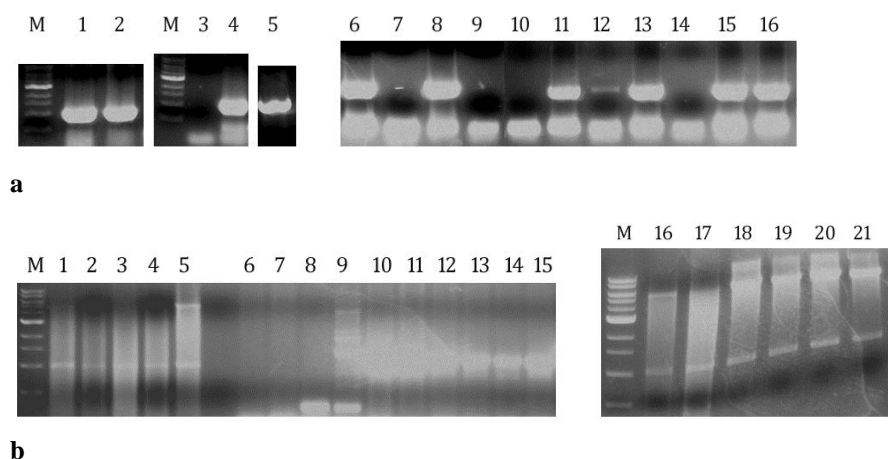
Kromatogram za proteinsku varijantu SerRSΔC (c), te analiza eluiranih frakcija na 9 % SDS-poliakriamidnom gelu nakon anionsko-izmjenjivačke kromatografije na kromatografskoj koloni *MonoQ* (d).

Unatoč uspješnom kloniranju, His-ΔNSerRS i His-ΔNSerRSΔC nisu uspješno pripremljeni u topljivom stanju. His-ΔNSerRS nije pokazao vidljivu ekspresiju bez obzira na različite uvjete temperature (15 °C, 25 °C, 37 °C) ili koncentracije IPTG-a (0,25 mmol dm⁻³, 0,5 mmol dm⁻³), dok je His-ΔNSerRSΔC pokazao ekspresiju jedino na 37 °C pri 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-a, no nakon sonikacije bakterijskih stanica uočeno je kako sav dobiveni protein taloži u obliku inkulzijskih tijela. Također, pokušaj regeneracije His-ΔNSerRSΔC iz inkluzijskih tijela nije bio uspješan. Izostajanje genske ekspresije, odnosno taloženje proteina u obliku inkluzijskih tijela vjerojatno je uzrokovano nepovoljnim smatanjem skraćenih proteina (nedostatak dijela N-terminalne domene s kojom katalitička srž proteina ostvaruje elektrostatske interakcije čime se stabilizira trodimenzionalna struktura proteina) što dovodi do trenutne razgradnje ili agregacije novonastalih proteinskih ostataka. Vjerojatno iz istog razloga niti His-NSerRS nije bio prisutan u topljivom obliku (pokazao je vidljivu ekspresiju na 37 °C uz 0,5 mmol dm⁻³ IPTG, dok na 15 °C nije bilo ekspresije), iako je ovdje regeneracija iz inkluzijskih tijela bila uspješna, te je nakon završene regeneracije protein u topljivom obliku pročišćen na Ni-NTA agarozu (slika 32. b). Pretpostavlja se kako se postepenom renaturacijom proteina u procesu regeneracije proteina iz inkluzijskih tijela ostavlja dovoljno vremena pravilnom smatanju proteina, što povećava vjerojatnost dobivanja topljivog proteina. His-NSerRS nikada nije podvrgnut provjeri ispravnosti smatanja, no primjećeno je kako dužim stajanjem čak i na niskim temperaturama (-80 °C) pokazuje sklonost ponovnom taloženju. Uzimajući u obzir dugotrajnost regeneracije i labilnost topljivog proteina, His-NSerRS uzorci nakon Ni-NTA agaroze nisu dodatno pročišćavani, nego su kao takvi uzimani za daljnje biofizičke analize.

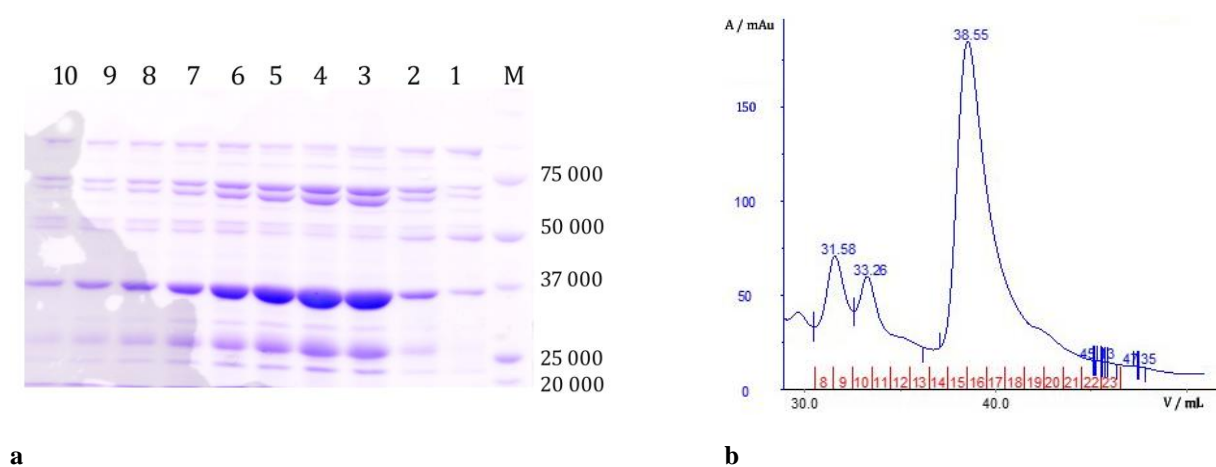
Glavninu središnjeg dijela proteina BEN1 čini regija homologna NAD(P)-veznoj domeni (pozicije 39-259), dok N-kraj proteina obiluje kiselim i polarnim aminokiselinama (slika 24.). Uzimajući ovo u obzir pripremljene su tri skraćene varijante proteina BEN1: proteina kojemu nedostaje prvih 17 aminokiselina na N-kraju, te posjeduje (His)₆-privjesak na N-kraju (His-ΔN17BEN1 - djelomično očuvan N-kraj proteina), protein kojemu nedostaje prvih 37 aminokiselina na N-kraju i posjeduje (His)₆-privjesak na C-kraju (ΔN37BEN1-His; gotovo u potpunosti uklonjena regija bogata hidrofilnim aminokiselinama na N-kraju prije NAD(P)-vezne domene), odnosno ista varijanta proteina, ali s (His)₆-privjeskom na N-kraju (His-

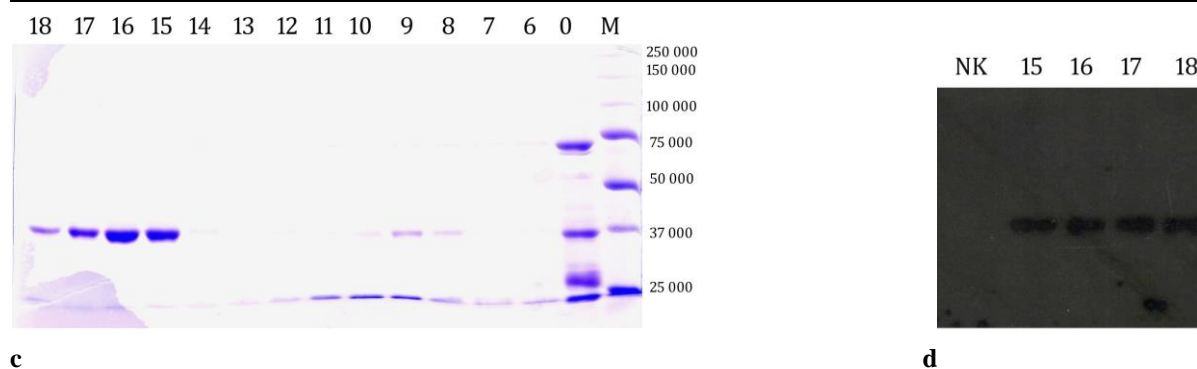
Δ N37BEN1). Za dobivanje skraćene varijante proteina Δ N37BEN1-His lančanom reakcijom *Phusion* DNA-polimeraze (s obzirom da nije bilo moguće dobiti željeni produkt lančanom reakcijom s *Pfu* DNA-polimerazom) umnožen je nukleotidni slijed i ubačen u plazmidni vektor pET28b između restrikcijskih mjesta *NcoI* i *XhoI*. Lančanom reakcijom s *Pfu* DNA-polimerazom umnoženi su nukleotidni sljedovi koji kodiraju za His- Δ N37BEN1, odnosno His- Δ N17BEN1, te ubačeni u vektor pPROEX Htb između restrikcijskih mjesta *NcoI* i *XhoI*. Za sve konstrukte uspješnost kloniranja potvrđena je kolonijskim PCR-om, restrikcijskom analizom (*NcoI* i *XhoI*) i sekvenciranjem (slika 33. i za His- Δ N17BEN1 slika 35. a). Nakon transformacije bakterija *E. coli* BL21 (DE3) u ekspresijskim analizama utvrđeno je kako Δ N37BEN1-His pokazuje relativno slabu ekspresiju na 30 °C, dok na nižim temperaturama ekspresija nije vidljiva. His- Δ N37BEN1 pokazao je zadovoljavajuću ekspresiju na 30 °C uz indukciju 0,25 mmol dm⁻³ IPTG-om, te je za daljnje biofizičke analize prednost dana ovoj varijanti u odnosu na Δ N37BEN1-His. His- Δ N17BEN1 pokazao je zadovoljavajuću ekspresiju na 15 °C uz indukciju 0,5 mmol dm⁻³ IPTG-om. Nakon uzgoja i sonikacije bakterijskih stanica, His- Δ N37BEN1 je pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA agarozu (slika 34. a). Potom je uslijedilo proteolitičko uklanjanje (His)₆-privjeska i kationsko-izmjenjivačka kromatografija na koloni *MonoS* u puferu pH = 6,0 kojom se nastojalo dodatno pročistiti i razdvojiti Δ N37BEN1 bez privjeska (pI = 8,46; M_r = 36 133) od eventualno zaostalog His- Δ N37BEN1 koji još uvijek ima privjesak (u slučaju da proteoliza nije bila maksimalno efikasna, kao što je to bio slučaj s His-BEN1). Analizom kromatografskih frakcija na SDS-poliakrilamidnom gelu uočena je samo jedna proteinska vrpca (slika 34. c). Ova proteinska vrpca mogla je nastati potpunim proteolitičkim otcjepljivanjem (His)₆-privjeska dajući protein Δ N37BEN1 ili se u protivnom radilo o His- Δ N37BEN1 što podrazumijeva da (His)₆-privjesak nije uopće otcjepljen (proteolitičko cijepanje nije bilo učinkovito). Stoga je provedena *western-hibridizacijska* analiza s mišjim monoklonskim anti-His antitijelima (slika 34. d). Analizom je utvrđeno postojanje (His)₆-privjeska u svim proteinskim frakcijama. S obzirom da je aktivnost proteaze *TeV* prethodno provjerena u reakciji s drugim supstratima, jedan od mogućih razloga neuklanjanja privjeska s His- Δ NBEN1 je smatanje ove skraćene varijante BEN1 proteina pri čemu je moguće da je (His)₆-privjesak maskiran u globularnoj trodimenzionalnoj strukturi i na taj način onemogućen dohvat katalitičkog mjesta proteaze. His- Δ N17BEN1 uspješno je pročišćen na Ni-NTA agarozu, a potom mu je djelovanjem proteaze *TeV* uspješno uklonjen (His)₆-privjesak.

Korištenjem kationsko-izmjenjivačke kolone *MonoQ* u puferu pH = 8,0 (pri 25 °C) uspješno su razdvojene frakcije proteina koji više nema privjeska od onog koji ga još uvijek ima (slika 35. b i c). Ovako pripremljeni proteini korišteni su u biofizičkim analizama.

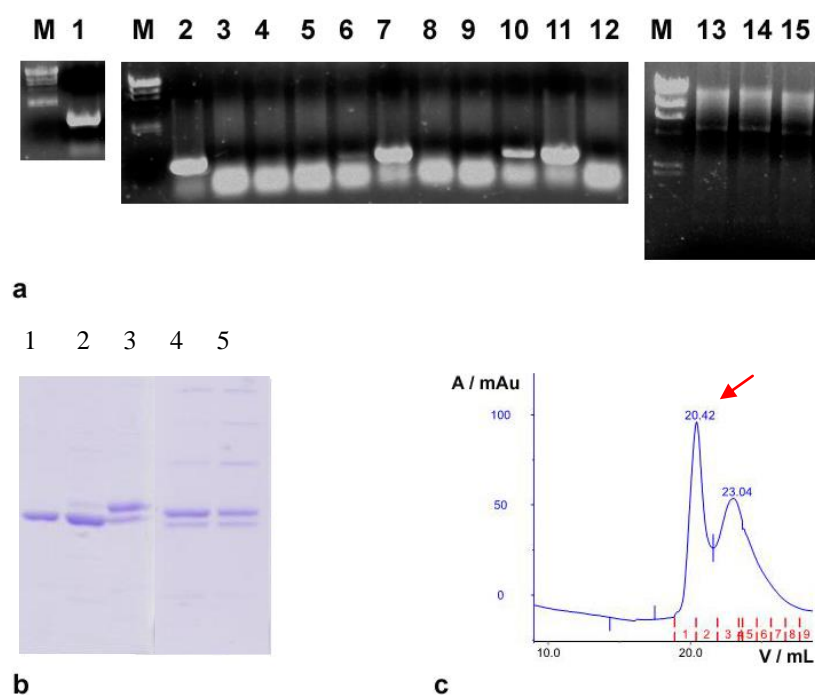


Slika 33. Prikaz uzoraka DNA na 1 % (w/v) gelu agaroze nakon PCR reakcije s *Taq* i *Pfu* DNA-polimerazom, produkata kolonijskog PCR-a i restrikcijskih analiza za potvrđivanje uspješnosti kloniranja gena za skraćene varijante BEN1 proteina. M- 1 kb DNA Ladder; **a**: produkti PCR reakcije s *Taq* DNA-polimerazom za ΔN37BEN1-His (linija 1) i His-ΔN37BEN1 (linija 2), odnosno s *Pfu* DNA-polimerazom za ΔN37BEN1-His (linija 3) i His-ΔN37BEN1 (linija 4); linija 5: produkt PCR reakcije s *Phusion* DNA-polimerazom za konstrukt ΔN37BEN1-His; linije 6-16: kolonijski PCR za His-ΔN37BEN1. **b**: linije 1-5: rezultati restrikcijske analize s *NcoI* i *XhoI* za konstrukt His-ΔN37BEN1; linije 6-15: kolonijski PCR s T7 univerzalnim početnicama za ΔN37BEN1-His; linije 16-21: rezultati restrikcijske analize s *NcoI* i *XhoI* za ΔN37BEN1-His.



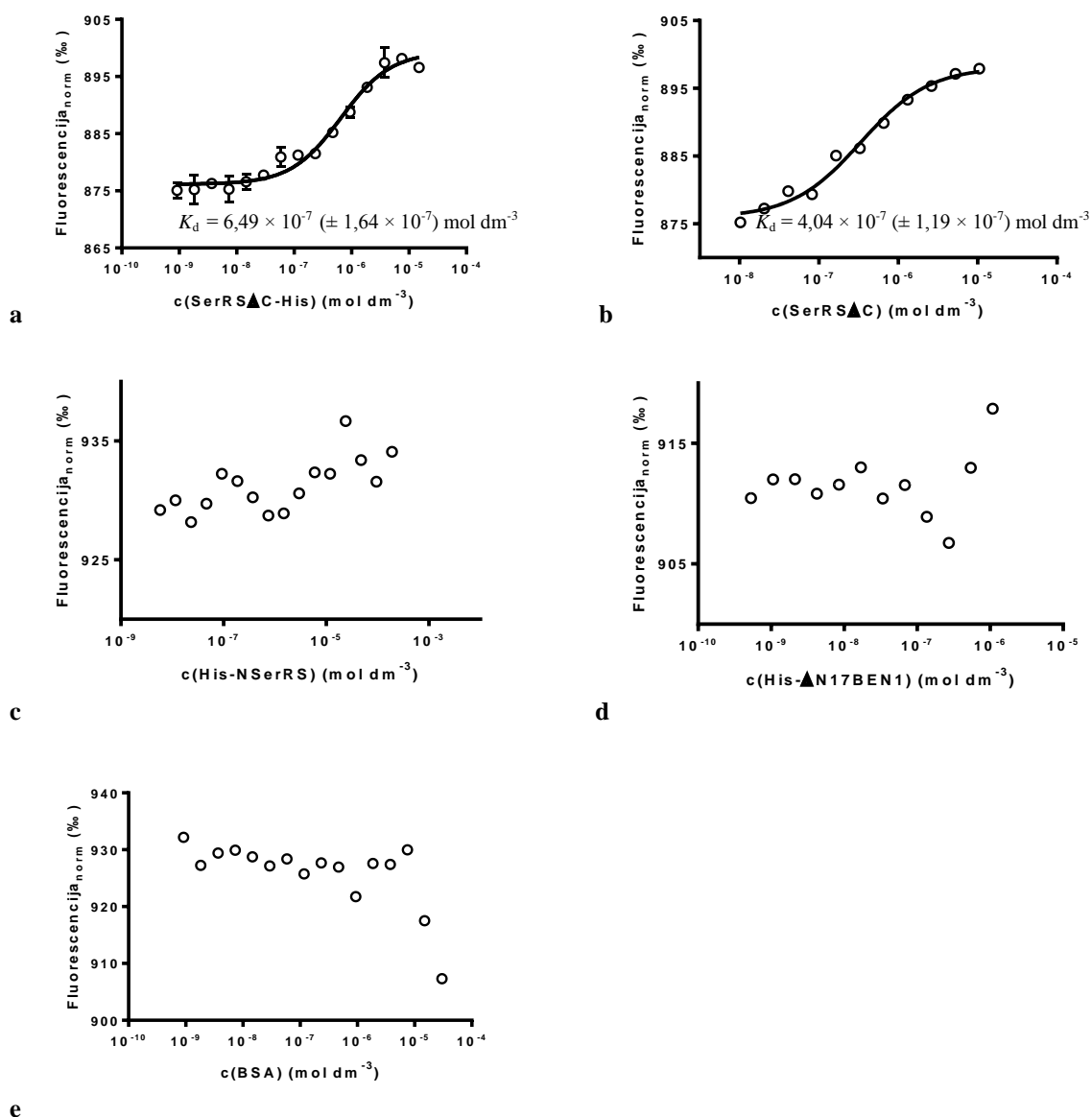


Slika 34. **a:** prikaz elucijskih frakcija His-ΔN37BEN1 na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu nakon Ni-NTA afinitetne kromatografije. **b:** kromatogram za kationsku izmjenu na kromatografskoj koloni *MonoS* i **c:** prikaz elucijskih frakcija na 9 % SDS-poliakrilamidnom gelu za His-ΔN37BEN1 proteinsku varijantu nakon proteolitičkog tretmana proteazom *TeV* radi uklanjanja (His)₆-privjeska. **d:** *western-hibridizacijska* analiza s anti-His antitijelima za izdvojene elucijske frakcije nakon kationske izmjene radi utvrđivanja efikasnosti proteolitičkog uklanjanja (His)₆-privjeska s His-ΔN37BEN1.



Slika 35. **a:** prikaz uzoraka DNA na 1 % (w/v) gelu agaroze za konstrukt His-ΔN17BEN1 nakon PCR reakcije s *Pfu* DNA-polimerazom (linija 1), produkti kolonijskog PCR-a (linije 2-12), produkti restrikcijske analize s *NcoI* i *XhoI* za odabrane pozitivne kolonije (linije 13-15). M: DNA faga λ pocijepana s endonukleazom HindIII. **b:** prikaz elucijskih frakcija nakon anionsko-izmjenjivačke kromatografije na koloni *MonoQ*. **c:** kromatogram nakon kromatografije na koloni *MonoQ* (strelicom je označena varijanta proteina bez (His)₆-privjeska).

U svrhu određivanja interakcijskih domena proteina SerRS i BEN1 u kompleksu, provedena su mikrotermoforetska mjerenja u kojima je koncentracija fluorescentno obilježenog proteina BEN1 održavana stalnom, dok su varijante proteina SerRS: SerRS Δ C-His (početna koncentracija 30 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), SerRS Δ C (početna koncentracija 42 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) i His-NSerRS (početna koncentracija 190 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) pripremljene u decimalnim razrijeđenjima. Nakon tri uzastopna mjerenja za smjesu SerRS Δ C-His i BEN1 potvrđena je proteinska interakcija i određena je konstanta disocijacije kompleksa BEN1:SerRS Δ C-His čija vrijednost iznosi $6,49 \times 10^{-7} (\pm 1,64 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$ (slika 36. a). Za smjesu SerRS Δ C i BEN1 napravljena su dva uzastopna mjerenja, te je također utvrđena proteinska interakcija, odnosno određena je vrijednost konstante disocijacije kompleksa BEN1:SerRS Δ C koja iznosi $4,04 \times 10^{-7} (\pm 1,19 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$ (slika 36. b). U slučaju His-NSerRS i proteina BEN1 nije detektirana proteinska interakcija (slika 36. c). Kako bi se provjerila specifičnost proteinske interakcije BEN1 i proteinskih varijanti SerRS, napravljeno je mikrotermoforetsko mjerenje smjese BEN1 i albumina iz seruma goveda (eng. *bovine serum albumin*, BSA; početna koncentracija BSA iznosila je 7,5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) koje nije potvrdilo nastajanje proteinskog kompleksa između ova dva proteina (slika 36. e).



Slika 36. Mikrotermoforetsko ispitivanje proteinske interakcije između **a:** fluorescentno označenog proteina BEN1 i SerRSΔC-His, **b:** fluorescentno označenog proteina BEN1 i SerRSΔC, **c:** fluorescentno označenog proteina BEN1 i His-NSerRS, **d:** fluorescentno označenog proteina SerRS i His-ΔN17BEN1 i **e:** fluorescentno označenog proteina BEN1 i BSA (negativna kontrola).

Tablica 12. Konstante disocijacije prema grafičkim prikazima (slika 29. i 36.) dobivenim u mikrotermoforetskim mjerenjima.

	$K_d / \text{mol dm}^{-3}$
BEN1 + SerRS	$4,45 \times 10^{-7} (\pm 1,40 \times 10^{-7})$
BEN1 + SerRSΔC-His	$6,49 \times 10^{-7} (\pm 1,64 \times 10^{-7})$
BEN1 + SerRSΔC	$4,04 \times 10^{-7} (\pm 1,19 \times 10^{-7})$

Mikrotermoforetski eksperimenti smjese His- Δ N37BEN1 i SerRS provedeni su na način da je prvotno korišten fluorescentno obilježen His- Δ N37BEN1, dok je u drugom navratu napravljen obrat, te je fluorescentno obilježen protein SerRS. U oba slučaja određivanje konstante disocijacije kompleksa nije bilo moguće zbog intenzivnog agregiranja proteina u kapilarama koje nije bilo moguće spriječiti niti uz dodatak deterdženta u puferu, odnosno dodavanjem inertnih proteina poput BSA. S druge strane mikrotermoforetski eksperimenti smjese His- Δ N17BEN1 i SerRS izvedeni su uspješno i nisu pokazali nastajanje kompleksa His- Δ N17BEN1:SerRS što jasno upućuje na zaključak kako je za interakciju važan hidrofilan N-kraj proteina BEN1 (slika 36. d), dok je iz prethodnih mjerenja vidljivo kako C-kraj proteina SerRS nije bitan za interakciju (slika 36. a i b).

4.4. Identifikacija interaktora SerRS metodom TAP-MS

Prednost TAP-MS u odnosu na Y2H leži u činjenici da se ovdje interakcija SerRS-a i njegovih potencijalnih proteinskih partnera događa u biljnoj stanici transgenične biljke *A. thaliana*, dok se u metodi Y2H biljni proteini nalaze u stanici kvasca - okolini koja je ipak značajno drugačija u odnosu na biljnu stanicu. Pretraga TAP-MS provedena je tri puta na uglavnom tri tjedna starim transgeničnim biljkama *A. thaliana* (koje su dobivene ljubaznošću dr. sc. Nataše Bauer) s nadeksprimiranim SerRS-TAP kao proteinom mamcem kako je detaljno opisano u poglavlju 3.4.2. *Materijala i metoda*. U sve tri pretrage kao glavna potencijalnih interakcijskih partnera SerRS proizašli su različiti ribosomski proteini, od kojih su većina vjerojatno nespecifično pročišćeni zajedno sa SerRS, jer se nalaze u velikim količinama u stanici (primjerice kloroplastni ribosomski proteini). Niti jedan protein se nije pojavio u sve tri pretrage, tako da su za daljnje analize odabrani oni potencijalni partneri za koje su otprije iz drugih istraživanja postojale naznake o mogućoj interakciji sa SerRS-om, odnosno gdje je interakcija dva proteina mogla biti funkcionalno i smisleno objašnjena. Tako se primjerice translacijski elongacijski faktor EF2 (TAIR oznaka: AT1G560707.1) pojavio samo u prvoj TAP-MS pretrazi, no odabran je stoga što je ranije SPR metodom dokazana interakcija SerRS metanogenog tipa iz arheje *M. thermoautotrophicus* s EF-G proteinom, inače homologom proteina eukariota EF2 (V. Godinić-Mikulčić, neobjavljeni rezultati).

Nadalje, PNF (TAIR oznaka: AT4G27450.1) kao protein nepoznate funkcije za čiju ekspresiju je bilo pokazano da se inducira dodatkom aluminija bio je zanimljiv izbor s obzirom da je slično povećanje ekspresije dodatkom teških metala zabilježeno i kod SerRS-a iz biljke *A. thaliana* u prisutnosti kadmija.⁹ Ribosomski protein RPL9-1 (TAIR oznaka: AT1G33120.1) pronađen je u dvije uzastopne TAP-MS pretrage, a od ranije je poznato kako njegov homolog, protein L6 interagira sa SerRS-om u metanogenoj arheji.⁴⁹ Protein glutation-S-transferaza phi 2 (GSTF2) (TAIR oznaka: AT4G02520.1) je odabran zbog ranijih spoznaja kako GST proteini sudjeluju u odgovoru stanice na stres (a za SerRS je pokazano da sudjeluje u staničnom odgovoru na stres⁹). U sve tri TAP-MS pretrage kao kontrola specifičnosti interakcije SerRS i potencijalnih proteinskih partnera paralelno je provedena TAP-MS pretraga za otkrivanje potencijalnih interaktora proteina BPM1 (TAIR oznaka: AT5G19000.1). Ovaj protein je funkcionalno udaljen od SerRS-a, te se može smatrati za proteine koji su nađeni u obje pretrage da su lažni pozitivni.

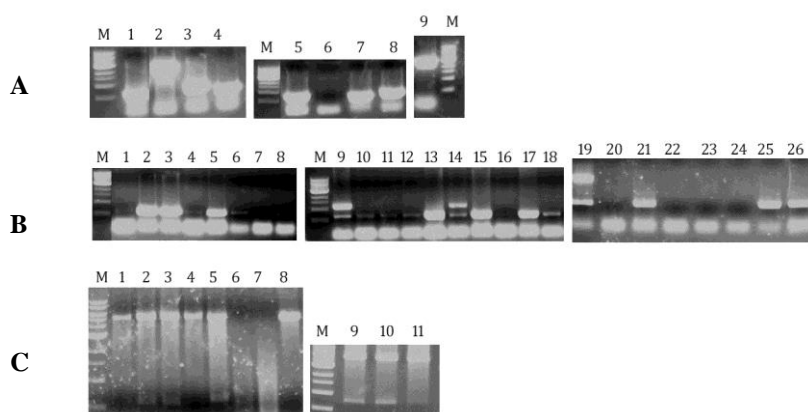
Tablica 13. Pregled odabranih potencijalnih proteinskih interaktora citosolne SerRS iz *A. thaliana* detektiranih metodom afinitetnog supročišćavanja spregnutom spektrometrijom masa.

TAIR oznaka	Naziv proteina	Učestalost nalaženja u TAP-MS pretragama	Broj pronađenih peptida	Funkcijski značaj
At1G56070.1	Elongacijski faktor EF2 (EF2)	I pretraga	7	Uključen u odgovor biljke na hladnoću, citokinine, sudjeluje u sintezi proteina- elongaciji.
At4G27450	Protein nepoznate funkcije (PNF)	I pretraga	4	Nije mu poznata biološka funkcija. (Homolog EF2 proteina, protein EF-G interagira sa SerRS u metanogenoj arheji.)
At4G02520	Glutation-S-transferaza-phi 2 (GSTF2)	I pretraga	2	Sudjeluje u odgovoru biljke na različite oblike stresa, u oksidacijsko-redukcijskim procesima. Induciran povećanom koncentracijom aluminija u stanici.
At1G33120.1	Ribosomski protein L9-1 (RPL9)	II i III pretraga	2,4	Sudjeluje u translaciji. (Homolog RPL9 proteina, protein L6 interagira sa SerRS u metanogenoj arheji. ⁴⁹)

Lančanom reakcijom *Pfu* DNA-polimeraze (za PNF, GSTF2, RPL9-1) i *Phusion* DNA-polimeraze (za EF2) pripremljeni su PCR-fragmenti (slika 37. A) za ubacivanje kodirajućih sljedova u pPROEX Htb plazmidni vektor između restrikcijskih mjesta *EcoRI* i *NotI* (za EF2 i RPL9-1), odnosno *BamHI* i *NotI* (za PNF i GST) tako da fuzijski proteini sadrže (His)₆-privjesak na N-kraju. Kolonijski PCR i restrikcijske analize (isti restrikcijski enzimi koji su

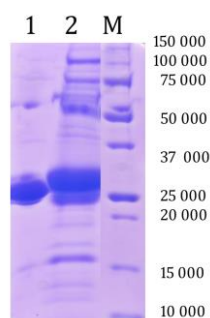
korišteni za kloniranje) pokazali su uspješno kloniranje za konstrukte PNF, GSTF2 i RPL9-1 (slika 37. B i C), dok su izostali pozitivni rezultati za EF2. Sekvenciranjem je potvrđena uspješnost kloniranja za konstrukte PNF, GSTF2 i RPL9-1.

Optimalna ekspresija proteina GST postignuta je pri 0,25 mmol dm⁻³ IPTG-a na 37 °C, nakon čega je pročišćen afinitetnom kromatografijom na GST-agarozu do relativno visoke čistoće (slika 38., linija 1). Protein PNF optimalno je eksprimiran kroz 12 sati na 15 °C uz dodatak 0,25 mmol dm⁻³ IPTG-a, nakon čega je djelomično pročišćen afinitetnom kromatografijom na Ni-NTA kromatografiji (slika 38.). Ovako pročišćeni uzorci GSTF2 i PNF korišteni su u daljnjim biofizičkim analizama. Uzorak RPL9-1 nije pokazivao vidljivu ekspresiju na nižim



Slika 37. Prikaz uzorak DNA na 1 % (w/v) gelu agaroze nakon PCR reakcije s *Taq* i *Pfu* DNA-polimerazom, produkata kolonijskog PCR-a i restriksijskih analiza za potvrđivanje uspješnosti kloniranja kodirajućih sljedova za RPL9-1, PNF, EF2 i GSTF2 proteine. M- 1 kb DNA Ladder **A:** produkti PCR-a s *Taq* DNA-polimerazom za konstrukte RPL9-1 (linija 1), EF2 (linija 2), PNF (linija 3) i GSTF2 (linija 4), odnosno s *Pfu* DNA-polimerazom-RPL9-1 (linija 8), EF2 (linija 6), PNF (linija 5) i GST (linija 7); produkt PCR-a s *Phusion* DNA-polimerazom za konstrukt EF2 (linija 9). **B:** kolonijski PCR za konstrukte RPL9-1 (linije 1-8), GST (linije 9-18) i PNF (linije 19-26). **C:** rezultati restriksijske analize s *EcoRI* i *NotI* za konstrukt RPL9-1 (linije 1-3) i s *BamHI* i *NotI* za konstrukt GST (linije 4-8) i PNF konstrukt (linije 9-11).

temperaturama (15 °C, 20 °C), dok je na 30 °C taložio u obliku inkluzijskih tijela (nije prikazano). Kako bi se povećala topljivost proteina, naknadno je pokušana ekspresija RPL9-1 proteina s GST-privjeskom na N-kraju proteina. U tu svrhu nukleotidni slijed za RPL9-1 ubačen je u plazmidni vektor pGEX-6P-2 između restriksijskih mjesta *EcoRI* i *NotI*, te je ekspresija ispitivana na 15 i 30 °C, no i ovdje je dolazilo do taloženja proteina u obliku inkluzijskih tijela na obje temperature (nije prikazano).



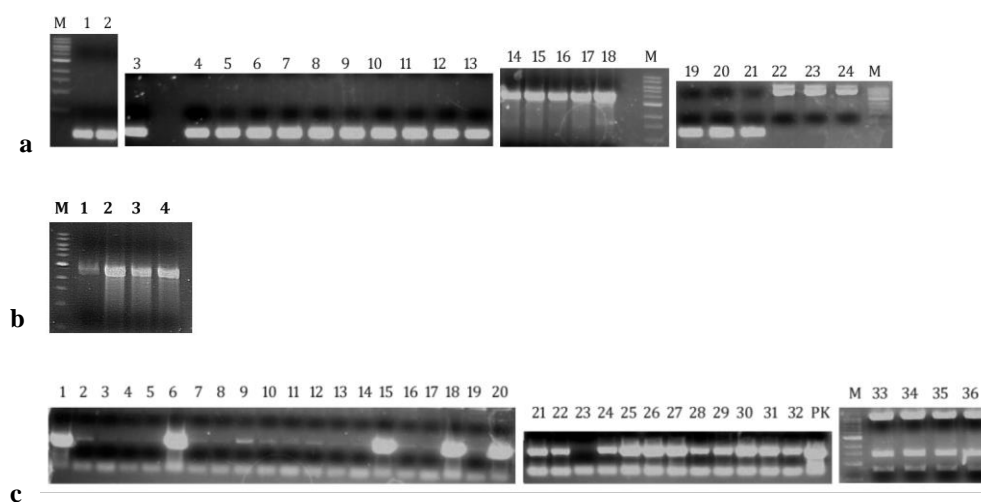
Slika 38. Analiza elucijskih frakcija nakon afinitetnih kromatografija za protein GSTF2 (na GST-agarози) (linija 1) i protein PNF (na Ni-NTA agarози) (linija 2) na 12 % SDS-poliakrilamidnom gelu.

4.5. Lokalizacija SerRS u stanici

Poznato je kako neke aminoacil-tRNA-sintetaze mogu ući u jezgru i na taj način ispoljiti svoje nekanonske funkcije. Tako primjerice, humana citosolna SerRS na svome C-kraju sadrži dodatnu domenu UNE-S u koju je inkorporiran nuklearni lokalizacijski signal bogat nabijenim aminokiselinama pri fiziološkom pH s bazičnim lizinom u najvećem udjelu (**KKQKKQHEGSKKK**).⁵ Sličan aminokiselinski slijed bogat lizinima (TFLPF**KA**KPVVADTK**GKKS**KA) sadrži i citosolna SerRS iz biljke *A. thaliana* na svome C-kraju. Zanimljivo je da redoslijed lizina, iako ne identičan, vrlo sliči redoslijedu lizina u bipartitnom nuklearnom lokalizacijskom signalu kod proteina *VirE2 NSE2* iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (FEEFERAI**KT**KYGS**DTEIKLKS**KSGIMHDSK)¹³³ što svakako podupire pretpostavku da C-kraj citosolne SerRS iz biljke *A. thaliana* sadrži signal koji ga vodi u jezgru. Kako bi se odredila lokalizacija proteina SerRS u stanici pripremljene su proteinske fuzije dijela proteina, kao i cjelovitog proteina SerRS s GFP-om. Primjenom Gateway tehnologije kloniranja kako je opisano ranije u poglavlju 3.2.10. prvo su u polazni vektor pDONR207 ubačeni: nukleotidni slijed koji kodira za posljednje 24 aminokiseline na C-kraju SerRS (potencijalni NLS, C24), odnosno cjeloviti SerRS. Nakon transformacije stanica bakterije *E. coli* BL21(DE3) praćen je rast bakterija na hranjivim podlogama s gentamicinom, odnosno za odabrane kolonije narasle na ovim pločama i rast na podlogama s kloramfenikolom gdje se u slučaju bakterija koje su primile plazmid s kodirajućim slijedom od interesa nije očekivao rast. Iz provjerenih bakterijskih kolonija izolirana je plazmidna DNA i podvrgnuta PCR i restrikcijskoj analizi. Za C24 uzorke korišten je par početnica

ATCLF i ATCLR, te je u svim uzorcima dokumentirana pristunost kodirajućeg slijeda od interesa. Za restrikcijsku analizu korištena je kombinacija *BamHI* (cijepa u kazeti između *att* regija) i *EcoRV* (cijepa pDONR207 na mjestu izvan *att* regija) restrikcijskih endonukleaza. U slučaju uspješnog kloniranja plazmid bi trebao biti lineariziran (slika 39. a), dok u slučaju nepostajanja kodirajućeg slijeda od interesa između *att* regija nastaju dva fragmenta. Kod uzoraka cjelovitog SerRS restrikcijska analiza s *EcoRV* uputila je na uspješnu ugradnju gena u vektor (slika 39. b). *EcoRV* cijepa gen za SerRS na samom početku, tako da u restrikcijskoj analizi u slučaju uspješnog kloniranja na gelu agaroze (1% (w/v)) treba očekivati dvije vrlo bliske vrpce (veličina 2254 i 2464 pb), dok u slučaju praznog vektora dolazi do linearizacije što je vidljivo u obliku jedne vrpce veličine 5585 pb.

Uspješnost rekombinacije C24 i SerRS kodirajućih slijedova iz pDONR207 u odredišne vektore pB7WGF2,0 (GFP privjesak dodan je na N-kraj fuzijskog proteina) i pB7FWG2,0 (GFP privjesak dodan je na C-kraj fuzijskog proteina) praćena je nasađivanjem transformiranih bakterija *E. coli* na hranjive podloge sa streptomycinom, odnosno za odabrane kolonije (narasle na ovoj podlozi) i na podlozi s gentamicinom. Naime, prilikom transformacije može se dogoditi da se bakterijska stanica transformira i s polaznim i s odredišnim plazmidom, što joj onda omogućuje rast na podlozi i s gentamicinom i streptomycinom, a ne samo streptomycinom kako je očekivano. Odabrani uzorci koji nisu pokazivali rast na gentamicinu podvrgnuti su izolaciji plazmidne DNA radi daljnje potvrde pristunosti kodirajućeg slijeda od interesa u odgovarajućim plazmidima. GFP-C24 i GFP-SerRS uzorci provjereni su sekvenciranjem i PCR-om (par početnica za GFP-NLS: ATCLF i ATCLR, odnosno par početnica za GFP-SerRS: SRSATN i SRSATC). Obje analize potvrdile su uspješnu rekombinaciju za oba konstrukta (slika 39. c). Uzorci SerRS-GFP provjereni su PCR analizom uz korištenje istih početnica kao i u slučaju GFP-SerRS, no ovdje je umjesto

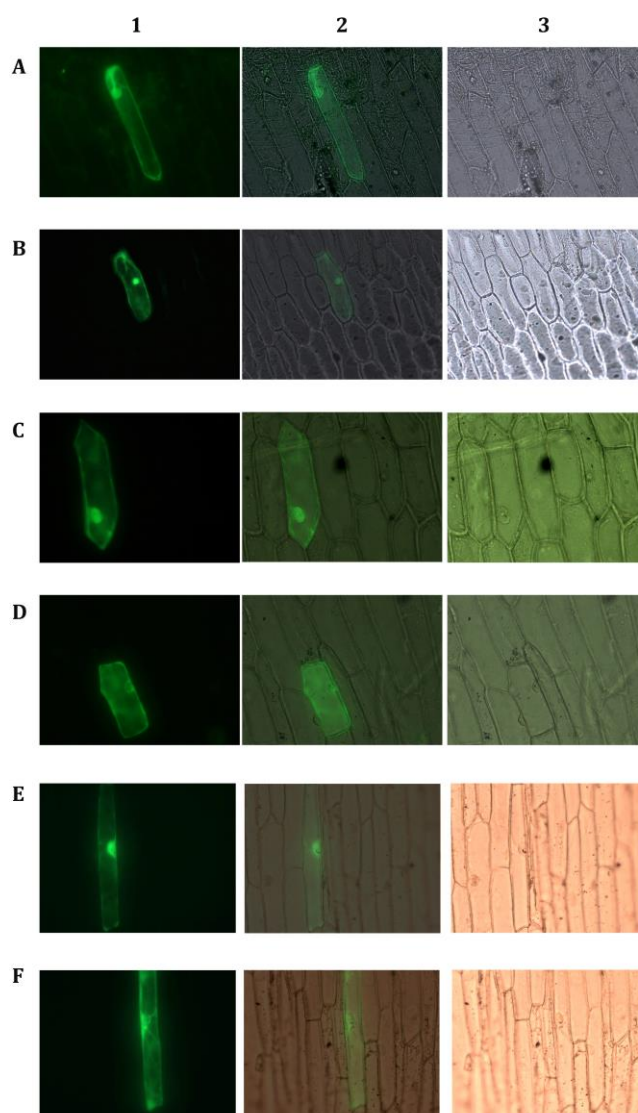


Slika 39. Prikaz uzoraka DNA na 1 % (w/v) gelu agaroze nakon PCR-a s *Taq* i *Pfu* DNA-polimerazom, produkata kolonijskog PCR-a i restrikcijskih analiza za potvrđivanje uspješnosti kloniranja kodirajućeg slijeda za GFP-C24, GFP-SerRS i SerRS-GFP. M- 1 kb DNA Ladder. **a:** produkti PCR-a *Taq* DNA-polimerazom (linija 1) i *Pfu* DNA-polimerazom (linija 2) za varijantu GFP-C24; linija 3: pozitivna kontrola PCR-a; linije 4-13: rezultati PCR-a za dokazivanje uspješnog kloniranja kodirajućeg slijeda za C24 u polazni vektor pDONR207; linije 14-18: rezultati restrikcijske analize s *EcoRV* i *BamHI* za C24 konstrukt u pDONR207 vektoru, pri čemu se u slučaju uspješnog kloniranja očekuje linearizacija plazmidnog vektora; linije 19-21: provjera uspješnosti rekombinacije C24 u odredišni vektor pB7WGF2,0 PCR-om; linije 22-24: prikaz izoliranih odredišnih plazmida s kojima je napravljena kontrolna PCR. **b:** linije 1-4: restrikcijska analiza s *EcoRV* pDONR207 vektora nakon rekombinacije sa SerRS. **c:** linije 2-20: rezultati PCR reakcije za provjeru ugradnje kodirajućeg slijeda za SerRS u odredišni vektor pB7WGF2,0 (GFP-SerRS), linija 1: pozitivna kontrola PCR-a; linije 21-32: PCR za provjeru ugradnje kodirajućeg slijeda za SerRS u odredišni vektor pB7FWG2,0 (SerRS-GFP); linije 33-36: rezultati restrikcijskog djelovanja restrikcijskog enzima *HindIII* na odredišnom vektoru pB7FWG2,0 nakon rekombinacije sa SerRS *HindIII* radi potvrđivanja uspješnosti rekombiniranja (u slučaju uspješne rekombinacije očekuju se fragmenti veličina 9261, 1205, 753 i 309 pb, od kojih je zadnji teško vidljiv na 1 % (w/v) agaroznom gelu).

sekvenciranja provedena restrikcijska analiza uz korištenje restrikcijske endonukleaze *HindIII* koja cijepa i unutar gena za cjeloviti SerRS (na tri mjesta) i unutar plazmida (jedno mjesto) pri čemu nastaju fragmenti veličina 9261, 1205, 753 i 309 pb (na slici 39. c vidljiva su tri fragmenta, dok četvrti zbog nedovoljne rezolucije agaroznog gela nije moguće vidjeti). Ovako pripremljeni i provjereni odredišni plazmidni vektori (pB7WGF2,0_GFP-SerRS, pB7WGF2,0_GFP-C24 i pB7FWG2,0_SerRS-GFP) korišteni su u lokalizacijskim eksperimentima.

4.5.1. Fluorescencijska mikroskopska analiza

Fluorescencijska mikroskopska analiza provedena je na stanicama pokožice luka *Allium cepa* koje su prethodno bombardirane smjesom čestica zlata i plazmidne DNA za fuzijske konstrukte GFP-C24, odnosno GFP-SerRS i SerRS-GFP kako je ranije opisano u poglavlju 3.2.6.1. *Materijala i metoda*. U slučaju konstrukta GFP-C24 u svim uspješno transformiranim stanicama zabilježena je prisutnost signala i u citosolu i u jezgri (slika 40. B). Iako se GFP vrlo često koristi kao fluorescentni marker pri praćenju ulaska u jezgru drugih proteina koji s njim fuzioniraju, on zbog svoje male molekulske mase ($M_r = 27\ 000$) može samostalno i nespecifično ulaziti u jezgru biljne stanice (slika 40. A). Ukoliko se fuzionira s proteinima velike molekulske mase, sposobnost neovisnog ulaska GFP-a u jezgru se drastično smanjuje, no u fuzijama s malim proteinima ili proteinskim ostacima mogućnost nespecifičnog ulaska GFP-a u jezgru je još uvijek vrlo velika. S obzirom da je C24 relativno malen proteinski ostatak (24 aminokiseline), pozitivan signal fuzije GFP-C24 u jezgri stanice nije isključiv dokaz funkcionalnosti C24 ostatka kao potencijalnog NLS-a. Upravo stoga su provedeni i eksperimenti u kojima su korišteni cjeloviti proteini SerRS s dodanim GFP-markerom. Stanice pokožice luka odvojeno su bombardirane smjesama koje su sadržavale cjelovite SerRS s GFP privjescima na N-, odnosno C-kraju proteina kako bi se isključio eventualan utjecaj GFP-a na funkcionalnost potencijalnog nuklearnog lokalizacijskog slijeda na C-kraju proteina. Mikroskopskom analizom utvrđeno je kako u oba slučaja uspješno transformirane stanice većinom ne pokazuju pozitivan signal fuzije GFP i SerRS u jezgri (slika 40. D i F), no u malom broju stanica zabilježena je prisutnost fuzijskog konstrukta unutar jezgre (slika 40. C i E).

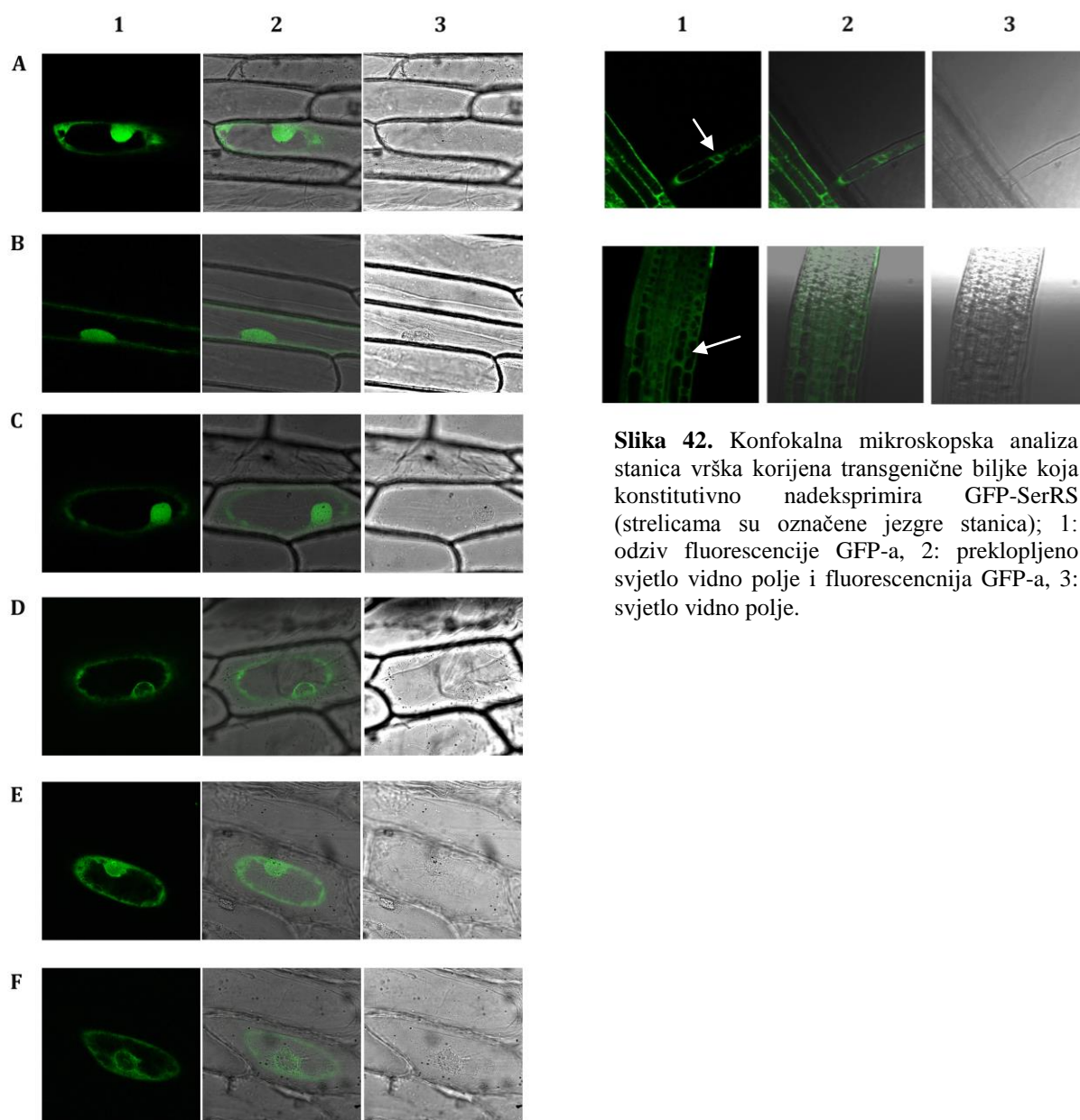


Slika 40. Fluorescencijska mikroskopska analiza: 1: odziv fluorescencije GFP-a, 2: preklopljeno svjetlo vidno polje i fluorescencija GFP-a, 3: svjetlo vidno polje. Stanice pokožice luka *A. cepa* transformirane nukleotidnim slijedom koji kodira za proteine **A:** GFP (pozitivna kontrola) **B:** GFP-NLS, **C i D:** GFP-SerRS, **E i F:** SerRS-GFP. Pozitivan odziv lokalizacije u jezgri vidljiv je u svim uzorcima, osim **D i F**.

4.5.2. Konfokalna mikroskopska analiza

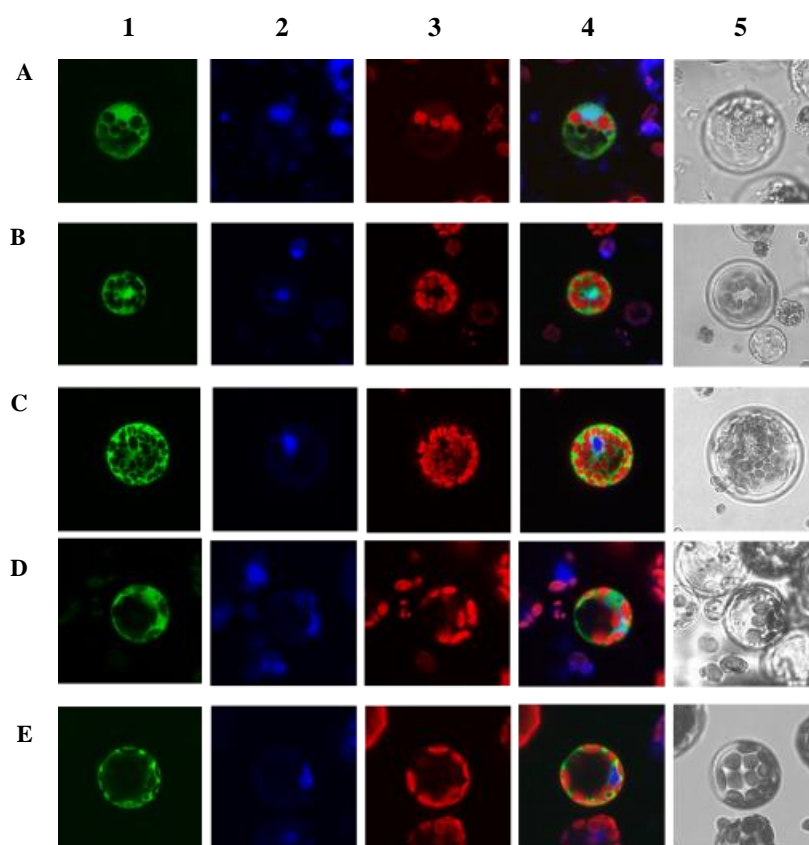
Konfokalna mikroskopska analiza provedena je na stanicama pokožice luka *A. cepa* i protoplastima biljke *A. thaliana* koje su prethodno bomardirane smjesom čestica zlata i plazmidne DNA za fuzijske konstrukte GFP i C24, odnosno SerRS. Također, analizirane su i

stanice vrška korijena transgenične biljke koja nadeksprimira fuzijski protein GFP-SerRS kako bi se analizirala lokalizacija u uvjetima konstitutivne nadekspresije. U konfokalnim mikroskopskim analizama stanica pokožice luka, pozitivan signal u jezgri uočen je u tek malom broju transformiranih stanica, dok većina stanica nije pokazivala pozitivan signal u jezgrama (slika 41.). Slični rezultati vidljivi su i kod analize vrška korijena transgenične biljke *A. thaliana* (slika 42.) gdje nije primjećena niti jedna stanica s pozitivnim signalom GFP-a u jezgri. Ovdje svakako treba uzeti u obzir ograničenja eksperimentalnog sustava u smislu velike gustoće stanica, odnosno njihove pojave u više slojeva što je značajno smanjivalo mogućnost jasnog razlikovanja jezgara, no trend izostajanja signala u jezgri (gdje je to bilo moguće jasno vidjeti) prati rezultate fluorescencijske i konfokalne analize na stanicama luka. Korištenjem protoplasta *A. thaliana* u konfokalnoj mikroskopskoj analizi ovaj problem je premošten, no kako su protoplasti sadržavali značajan broj kloroplasta koji su mogli maskirati jezgru bilo je potrebno koristiti boju DAPI koja specifično boji DNA u jezgri čime je moguće unutar stanice lokalizirati položaj jezgre. Konfokalnom analizom protoplasta uočen je očekivan ulazak samostalnog GFP-a (pozitivne kontrole) i GFP-C24 konstrukta u jezgru (slika 43. A i B), no vrlo je rijetko (10-20 % slučajeva) unutar jezgre detektiran signal za GFP-SerRS (slika 43. C i D), dok nije pronađena niti jedna stanica s pozitivnim signalom za konstrukt SerRS-GFP (slika 43. E). Iako bi se zbog malog broja stanica u kojima je detektiran signal koji potječe od konstrukta GFP-SerRS moglo spekulirati o unosu SerRS u jezgru u rijetkim i za stanicu neuobičajnim uvjetima (različiti oblici stresa), treba uzeti u obzir da nije zabilježen pozitivan signal u jezgri u slučaju kada se GFP nalazio na C-kraju proteina. Upravo stoga ne treba isključiti mogućnost da je u slučaju konstrukta GFP-SerRS došlo do preuranjene terminacije u sintezi proteina čime je nastao skraćeni protein male relativne molekulske mase koji je mogao nespecifično ući u jezgru ili je proteoliza uslijedila naknadno što je postiglo jednak učinak.



Slika 41. Konfokalna mikroskopska analiza: 1-odziv fluorescencije GFP-a, 2-preklopljeno svjetlo vidno polje i 3-svjetlo vidno polje. Stanice pokožice luka *A. cepa* transformirane su nukleotidnim slijedom koji kodira za proteine **A:** GFP (pozitivna kontrola), **B:** GFP-C24, **C i D:** GFP-SerRS, **E i F:** SerRS-GFP. Pozitivan odziv fluorescencije u jezgri vidljiv je u svim uzorcima, osim u **D i F**.

Slika 42. Konfokalna mikroskopska analiza stanica vrška korijena transgenične biljke koja konstitutivno nadeksprimira GFP-SerRS (strelicama su označene jezgre stanica); 1: odziv fluorescencije GFP-a, 2: preklopljeno svjetlo vidno polje i fluorescencija GFP-a, 3: svjetlo vidno polje.



Slika 43. Konfokalna mikroskopska analiza protoplasta *A. thaliana* transformiranih nukleotidnim slijedovima koji kodiraju za proteine **A:** GFP, **B:** GFP-C24, **C i D:** GFP-SerRS i **E:** SerRS-GFP. Konfokalna analiza rađena je na nekoliko razina signala: 1: fluorescencija GFP-a, 2: signal fluorescentne boje DAPI koja specifično boji jezgre, 3: signal fluorescencije kloroplasta, 4: preklapanje signala, 5: svijetlo vidno polje

4.6. Uloga SerRS u abiotičkom stresu

Utjecaj abiotičkih stresora na aaRS, a posebice na SerRS, slabo je istražen. Provedene morfološke i ekspresijske analize transgeničnih biljaka *A. thaliana* koje nadeksprimiraju protein SerRS-TAP potaknute su ranijim proteomičkim istraživanjem utjecaja kadmija na biljku *A. thaliana* u kojemu je zapaženo kako dolazi do povećanja koncentracije proteina SerRS u staničnoj suspenziji uslijed dodatka kadmija.⁹

4.6.1. Morfološke analize

Morfološke analize podrazumijevale su mjerenje duljine korijena klijanaca *A. thaliana* divljeg tipa, kao i dvije transgenične linije (linija 5 i 7) koje su nadekspimirale SerRS-TAP nasadenih na hranjive podloge MS bez stresora, odnosno uz dodatak ionskih stresora NaCl i KCl (redom 50 mmol dm^{-3} , 75 mmol dm^{-3} , 100 mmol dm^{-3} i 150 mmol dm^{-3}), osmotskog stresora manitola (redom 100 mmol dm^{-3} , 150 mmol dm^{-3} , 200 mmol dm^{-3} , 300 mmol dm^{-3}) i soli teškog metala CdCl_2 ($50 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, $100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, $200 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$). Praćenje rasta započelo je nakon trećeg dana od nasađivanja, a ovdje prikazani rezultati odgovaraju klijanima nakon 8 dana rasta (odnosno 10 u slučaju podloga s dodanim CdCl_2). Svi eksperimenti su napravljeni kao biološki duplikati, no ponegdje zbog kontaminacija plijesnima nije bilo moguće provesti eksperiment tijekom cijelog vremenskog perioda praćenja, te su u takvim slučajevima korišteni samo dostupni podaci za jedan uzgoj. Analizom sposobnosti klijanja i duljine korijena, vidljivo je da na podlozi bez stresora svi klijanci jednako uspješno proklijali i rastu (slika 44. A). Na podlogama s dodanim NaCl, povećanjem koncentracije soli smanjuje se efikasnost klijanja divljeg tipa u odnosu na transgenične biljke (75 i 100 mmol dm^{-3}), dok je na vrlo visokim koncentracijama od 150 mmol dm^{-3} klijanje vrlo sporo, a rast zanemariv i kod divljeg tipa i kod transgeničnih biljaka. Statistička analiza pokazuje kako je razlika u duljini korijena (kraći korijen u klijancima divljeg tipa) značajno vidljiva tek kod koncentracije od 100 mmol dm^{-3} i to u transgenične linije 7 (slika 44. B). U slučaju hranjivih podloga s dodanim KCl, značajne razlike u duljini korijenja između divljeg tipa i obje transgenične linije (u korist transgeničnih biljaka) vidljive su pri koncentraciji soli od 50 mmol dm^{-3} (za 75 mmol dm^{-3} zbog kontaminacije hranjive podloge plijesnima ne postoje podaci za duplikat), dok pri visokim koncentracijama klijanje je ponovno manje uspješno kod divljeg tipa biljaka, dok nema značajne razlike u duljini korijena između divljeg tipa i transgeničnih linija (jednako kao kod najviših koncentracija NaCl (150 mmol dm^{-3}) (slika 44. C). Analize duljine korijena u slučaju klijanaca na hranjivim podlogama pri koncentraciji manitola od 100 mmol dm^{-3} nije pokazala značajne razlike između divljeg tipa i transgeničnih linija, dok je pri koncentraciji od 150 mmol dm^{-3} zabilježena značajna razlika u duljini korijena između divljeg tipa i klijanaca transgenične linije 7 (u korist transgenične biljke), dok linija 5 nije pokazivala značajne razlike. Pri višim koncentracijama javljaju se jednaki problemi s klijanjem i rastom kao i kod ionskog stresa (statističke analize zbog

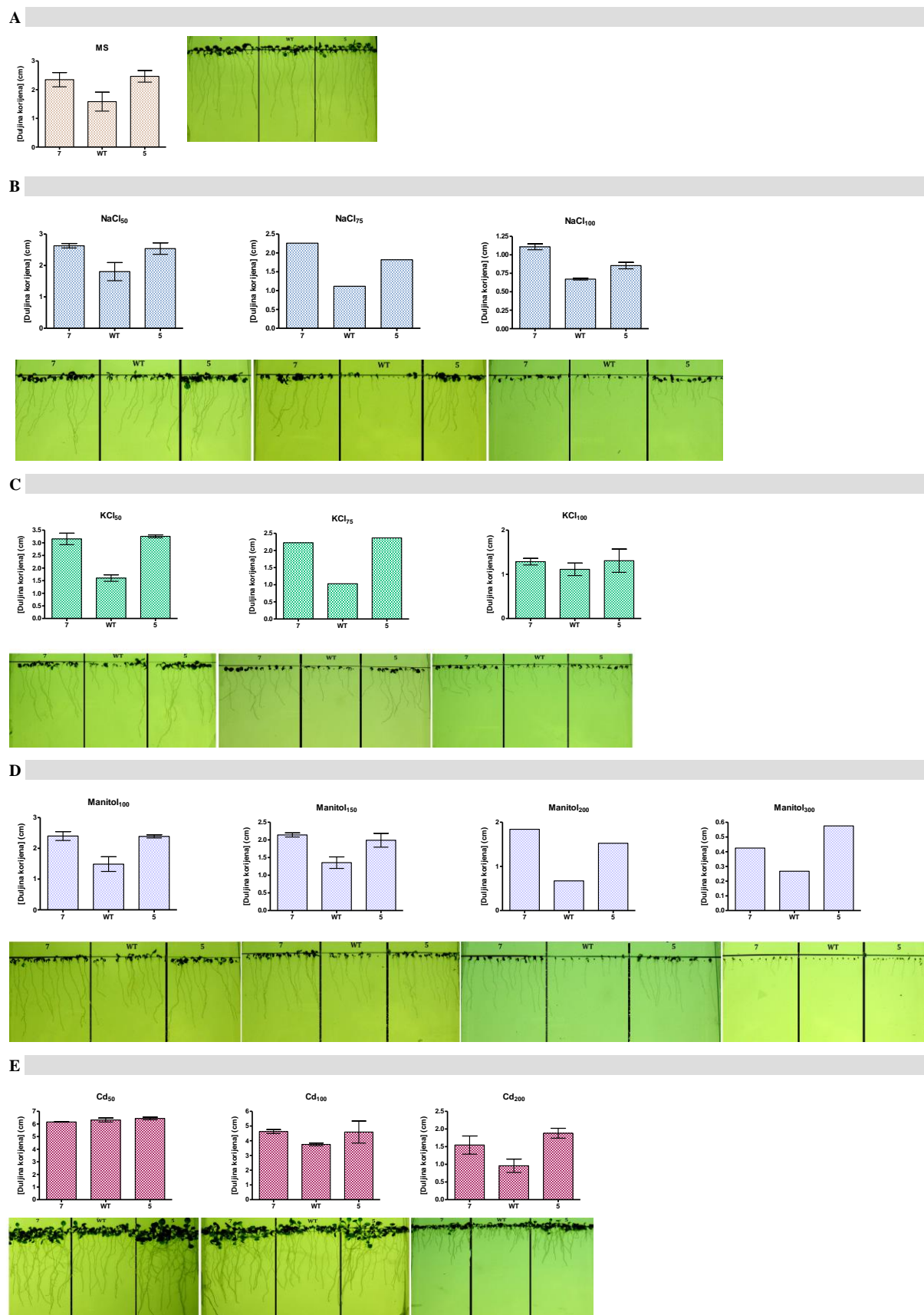
kontaminacije nisu bile moguće) (slika 44. D). U slučaju hranjivih podloga s CdCl_2 značajna razlika u duljini korijena zabilježena je samo pri koncentraciji kadmijeve soli od $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ za klijance transgenične linije 7 u odnosu na ostale klijance. Ovdje nisu bili vidljivi problemi s efikasnošću klijanja kod divljeg tipa (slika 44. E).

4.6.2. Ekspresijske analize

Upotrebom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR) uspoređivana je ekspresija *serS* i *ben1* gena u biljkama divljeg tipa, kao i u dvije linije transgeničnih biljaka *A. thaliana* (linija 5 i 7) koje nadeksprimiraju SerRS-TAP kako bi se utvrdilo postoji li značajna razlika u ekspresiji gena *ben1* u transgeničnim biljkama u odnosu na divlji tip s obzirom da je metodama *in vivo* i *in vitro* ranije dokazana interakcija proteina BEN1 i SerRS. Napravljena su tri odvojena uzgoja biljaka *A. thaliana* divljeg tipa i transgeničnih linija (biološki triplicati), te je nakon svakog uzgoja napravljena izolacija ukupnih molekula mRNA koje su potom prevedene u molekule cDNA. Na ovim molekulama je dalje napravljen qPCR s početnicama za *serS*, *ben1* i gene koji kodiraju za fiziološki važne proteine koji su konstitutivno eksprimirani u stanici- ekspresijski standardi (u ovom slučaju gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenazu (*gapdh*), odnosno protein aktin 2 (*act2*)). Za svaki gen od interesa qPCR reakcija je napravljena tri puta (tehnički triplicati). Početna količina cDNA za određeni gen izračunata je određivanjem rednog broja ciklusa u qPCR reakciji u kojemu je došlo do izdizanja fluorescencijskog signala amplifikacije toga gena iznad razine signala šuma. Razina ekspresije gena *serS* i *ben1* utvrđena je usporedbom početne količine cDNA za ove gene u odnosu na količinu cDNA za gene *gapdh* i *act2*. Efikasnost qPCR reakcija je određena upotrebom *LinRegPCR* programa i uvijek je iznosila preko 95 %. Statistička obrada podataka napravljena je u *GraphPad* programu, te je pokazano kako se u odnosu na divlji tip ekspresija *ben1* gena smanjuje i u transgeničnoj liniji 5 (student T-test; $P(< 0,05) = 0,0295$; $T = 3,3165$; stupanj slobode = 4) i u liniji 7 (student T-test; $P(< 0,05) = 0,0149$; $T = 4,0933$; stupanj slobode = 4), te kako ova promjena ekspresije vjerojatno nije direktno korelirana promjenom ekspresije *serS* gena, budući da nadekspresija *serS* gena značajno varira između dvije transgenične linije (student T-test; $P(< 0,05) = 0,0297$; $T = 3,3089$, stupanj slobode = 4), dok

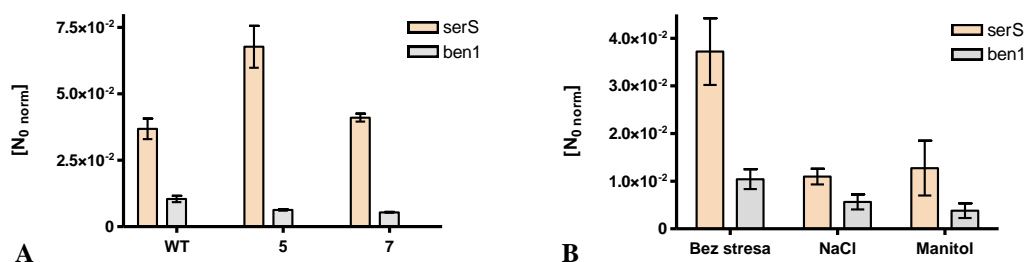
je smanjenje ekspresije *ben1* gena jednako (student T-test; $P (< 0,05) = 0,0506$; $T = 2,7640$, stupanj slobode = 4) (slika 45. A).

Također, na isti način je napravljena qPCR analiza cDNA dobivene iz biljaka *A. thaliana* divljeg tipa koje su nasađene na tri različite podloge (bez stresora, s dodanim 50 mmol dm^{-3} NaCl i s dodanim 100 mmol dm^{-3} manitolom). Ovdje nisu bili korišteni biološki triplikati, već duplikati, a utvrđeno je kako ekspresija gena *ben1* i *serS* statistički značajno ne varira na stresnim podlogama u odnosu na podlogu bez stresora (slika 45. B).



Slika 44. Statistička analiza apsolutne duljine korijena klijanaca *A. thaliana* biljaka divljeg tipa (WT) i dvije

linije transgeničnih biljaka koje nadeksprimiraju SerRS-TAP (linija 5 i 7) nakon 8 dana (odnosno 10 dana u slučaju **E**) rasta na *Murashige* i *Skoog* hranjivim podlogama nakon nasađivanja: **A**: bez stresora, **B**: uz dodatak NaCl (redom 50 mmol dm⁻³, 75 mmol dm⁻³, 100 mmol dm⁻³, dok uz 150 mmol dm⁻³ nije zamijećen rast klijanaca), **C**: KCl (redom 50 mmol dm⁻³, 75 mmol dm⁻³, 100 mmol dm⁻³, dok uz 150 mmol dm⁻³ nije zamijećen rast klijanaca), **D**: manitol (redom 100 mmol dm⁻³, 150 mmol dm⁻³, 200 mmol dm⁻³, 300 mmol dm⁻³) i **E**: CdCl₂ (50 μmol dm⁻³, 100 μmol dm⁻³, 200 μmol dm⁻³). U statističkim analizama uzimani su medijani vrijednosti duljina korijena za svaku skupinu biljaka (divlji tip i dvije transgenične linije), te su uz svaki statistički dijagram priložene odgovarajuće slike klijanaca.



Slika 45. A: razlika u ekspresiji gena *serS* i *ben1* (N_0 označava početnu količinu kalupa- molekula cDNA koje su dobivene reakcijom reverzne transkriptaze iz izolata ukupne mRNA stanice) između biljaka divljeg tipa (WT) i dvije linije transgeničnih biljaka koje nadeksprimiraju SerRS-TAP na hranjivim podlogama *Murashige* i *Skoog* bez stresora. **B:** ekspresija gena *serS* i *ben1* u biljkama *A. thaliana* divljeg tipa na hranjivim podlogama *Murashige* i *Skoog* bez stresora, odnosno na podlogama s dodanim 50 mmol dm⁻³ NaCl, odnosno 100 mmol dm⁻³ manitolom.

§ 5. RASPRAVA

5.1. Aktivnost i specifičnost prepoznavanja supstrata SerRS enzima

Aktivnost pročišćenih proteina SerRS i SerRS-His određivana je ispitivanjem njihove sposobnosti aminoacililiranja heterolognih molekula tRNA^{Ser} iz bakterije *E. coli* i kvasca *S. cerevisiae* s obzirom da homologna biljna tRNA^{Ser} nije bila dostupna. Iz rezultata je vidljivo da je bez obzira na vrstu tRNA, brzina aminoaciliranja bila preko 2 puta veća u korist proteina s (His)₆-privjeskom na C-kraju, što sugerira kako (His)₆-privjesak na C-kraju utječe na stabilnost SerRS-a, a time i njegovu funkciju. O bilo povoljnom ili nepovoljnom utjecaju (His)₆-privjeska na strukturu i funkciju proteina već je izvještavano u ranijim radovima. Tako je primjerice različit položaj (His)₆-privjeska na N- ili C-kraju *in vitro* smotane N-terminalne domene CRF receptora tipa 2a (eng. *corticotropin-releasing factor receptor type 2a*) iz štakora diktirao različit položaj disulfidnih mostova (u slučaju privjeska na N-kraju disulfidne veze su se uspostavljale između cisteina na položaju C2 i C3, te C4 i C6, dok su u slučaju privjeska na C-kraju veze uspostavljene između cisteina na položajima C2 i C5, te C4 i C6).¹¹⁸ Chant i suradnici (2005) izvještavaju o konformacijskim promjenama u DNA-veznom mjestu DNA-regulacijskog proteina AreA iz organizma *Aspergillus nidulans* nakon što mu je dodan His privjesak¹¹⁹, a Tajika i suradnici (2004) navode kako nisu bili u stanju kristalizirati nativni protein PH0828 iz *Pyrococcus horikoshii*, dok je varijanta s (His)₆ na C-kraju uspješno kristalizirana u istim kristalizacijskim uvjetima.¹²⁰ U slučaju proteina SerRS iz biljke *A. thaliana* u ovom radu u prilog hipotezi kako (His)₆-privjesak povećava stabilnost proteina SerRS pridonose i rezultati gel-filtracijske analize kojima je pokazano kako kromatogram SerRS-His proteina daje jedan diskretan pik koji po M_r odgovara dimeru (u skladu s očekivanjima za aaRS razreda II), dok je za protein SerRS bez privjeska na kromatogramu moguće zamijetiti dva diskretna pika od kojih prvi odgovara dimeru, a drugi monomernom obliku.

Od ranije je poznato kako enzimi SerRS mogu prepoznavati i uspješno aminoacilirati heterologne molekule tRNA^{Ser}. Atipična SerRS metanogenog tipa iz arheja *M. maripaludis* i

M. jannashii uspješno *in vitro* prepoznaje tRNA^{Ser} supstrate arhejskog, bakterijskog i eukariotskog tipa¹²¹ (iako u eksperimentima *in vivo* nije uočeno uspješno prepoznavanje bakterijske i kvašćeve tRNA^{Ser}¹²²). Kvašćeva SerRS eksprimirana u *E. coli* prepoznaje tRNA^{Ser} iz *E. coli* *in vivo* i *in vitro*¹²³, iako je specifičnost prepoznavanja značajno na strani homolognog supstrata (vrijednost k_{cat}/K_M za kvašćevu SerRS eksprimiranu i pročišćenu iz *E. coli* za tRNA^{Ser} iz *E. coli* iznosi $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$, dok je za tRNA^{Ser} iz *S. cerevisiae* čak 4 800 puta veća). Citosolna SerRS iz kukuruza *Zea mays* uspješno komplementira nedostatak kvašćeve citoslone SerRS u kvascu⁵⁶, a također i termolabilnu SerRS iz soja KL229 *E. coli*.¹²⁴ Za razliku od kvašćeve SerRS, kukuruzna SerRS prepoznaje bakterijske i eukariotske tRNA^{Ser} supstrate s gotovo jednakom katalitičkom efikasnošću (k_{cat} / K_M vrijednosti za tRNA^{Ser} iz *E. coli* iznosi $1,27 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$; za kvašćevu tRNA^{Ser} $1,43 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$). Vrlo slično ponašanje opaženo je u ovom radu u eksperimentima *in vitro* i kod citosolne SerRS iz biljke *A. thaliana* koja je pokazala sličan afinitet prema heterolognim tRNA^{Ser} supstratima iz bakterijskog i eukariotskog svijeta (vrijednost k_{cat}/K_M za tRNA^{Ser} iz *E. coli* iznosi $0,18 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$, a za tRNA^{Ser} iz *S. cerevisiae* $0,13 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$). Zanimljivo je vidjeti kako ponašanje ove dvije biljne aaRS značajno odstupa od uobičajenog obrasca prepoznavanja supstrata tRNA koji podrazumijeva kako citosolne SerRS pokazuju određeni stupanj svestranosti u izboru supstrata, ali je afinitet za eukariotskom tRNA uglavnom značajno veći u odnosu prema bakterijskoj tRNA, dok organelne i bakterijske SerRS bolje prepoznaju bakterijske i organelne tRNA^{Ser} koje su bakterijskog podrijetla (kukuruzna organelna SerRS uspješno je komplementirala temperaturno senzitivnu SerRS iz *E. coli* aminoacilirajući bakterijsku tRNA^{Ser}, dok je kvašćeva tRNA^{Ser} bila vrlo loš supstrat¹²⁵; u drugom eksperimentu bakterijska SerRS iz *E. coli* nije uopće prepoznavala kvašćevu tRNA^{Ser}¹²⁶). Još i prije nego je eksperimentalno uočena visoka efikasnost prepoznavanja bakterijske i eukariotske tRNA^{Ser} i kod citosolne SerRS iz uročnjaka, Rokov Plavec i suradnici (2013)¹²⁴ ponudili su moguće objašnjenje ovakvog ponašanja kod biljnih SerRS na primjeru kukuruza. Ovi autori su proveli bioinformatičku analizu jezgrenog genoma kukuruza u potrazi za tRNA^{Ser} kodirajućim genima i otkrili kako više od trećine ovih gena ima organelno podrijetlo. Unatoč uvriježenom mišljenju kako organelni geni u jezgri nemaju nikakvu funkciju, uslijed nedostatka eksperimentalnih dokaza koji bi potkrijepili ovu tvrdnju, isti autori zaključuju kako postoji realna mogućnost da su neki od organelnih gena u jezgri ekspresijski aktivni pri čemu nastaju organelne tRNA^{Ser} koje su endosimbiontskog

bakterijskog podrijetla koje u citoplazmi dolaze na dohvrat citosolnoj SerRS koja bi ih onda mogla aminoacilirati. Nadalje, zaključuju uzimajući u obzir podatke filogenetičkih analiza na *A. thaliana*¹²⁷ kako je moguće da su tijekom evolucije citosolne varijante biljnih SerRS zadržale sposobnost prepoznavanja bakterijske tRNA^{Ser}, budući da su geni za organelnu i citosolnu varijantu SerRS u slučaju *A. thaliana* nastale duplikacijom iz zajedničkog ishodišnog SerRS gena aktinobakterija (u jezgrenom genomu biljke *A. thaliana* nađeno je 5 organelnih tRNA^{Ser} gena).

5.2. Proteinske interakcije SerRS

AaRS kao i drugi proteini ulaze u proteinske interakcije radi ostvarivanja / pospješivanja svojih primarnih bioloških funkcija, no često makromolekularni kompleksi omogućuju proteinima ispoljavanje novih i drugačijih nekanonskih funkcija izvan translacije što značajno širi raspon njihovog bioaktivnog djelovanja. Poznati su kompleksi aaRS i njihovih proteinskih interaktora u arhejama, kvascu i sisavcima, no o biljnim aaRS, kao i o njihovim proteinskim interaktorima zna se vrlo malo. Upravo stoga, kako bi se proširilo znanje o ovoj problematici, te otkrili potencijalni proteinski interaktori citosolne SerRS iz biljke *A. thaliana* primjenjene su dvije različite *in vivo* pretražne metode (Y2H i TAP-MS), te dvije biofizičke *in vitro* metode (SPR i MST) kojima se nastojalo potvrditi i okarakterizirati prethodno otkrivene proteinske interakcije. Y2H metoda iznjedrila je nekoliko potencijalnih interaktora SerRS-a od kojih je najviše pažnje privukao protein BEN1 budući da jedini nije pokazao samostalnu sposobnost aktivacije izvjestiteljskih gena (autoaktivacijski test), a i do sada je relativno slabo istražen. Protein BEN1 kodiran je genom *ben1* (eng. *bri1-5 enhanced 1*) i po prvi put otkriven u genetičkim eksperimentima na biljnom mutantu *A. thaliana* neosjetljivom na brasinosteroide, točnije biljci s mutacijom na *bri1-5* alelu gena *bri1* (eng. *brassinosteroid insensitive 1*) koji kodira za brasinosteroidni receptor u plazma membrani stanice. Za razliku od ostalih mutantnih alela gena *bri1* koji su karakterizirani fenotipskim patuljastim rastom i sterilnošću biljaka, alel *bri1-5* omogućuje dobivanje fertilnih semi-patuljastih biljaka. Uvođenjem nasumičnih mutacija (eng. *large-scale gain-of-function genetic screen*) u jednom od eksperimenata na biljkama s alelom *bri1-5* zahvaćen je i gen *ben1* čime mu je povećana aktivnost, a što je pak posljedično rezultiralo pogoršavanjem ionako defektnog fenotipa

biljaka s alelom *bril-5*. U kontrolnim eksperimentima suprimiranjem aktivnosti gena *ben1* došlo je do produljenog rasta biljnih organa. Nadalje, analitičko profiliranje brasinosteroidnih spojeva u klijancima *A. thaliana* starih 5 tjedana s alelom *bril-5* i nadeksprimiranim *ben1* genom pokazalo je 2-4 puta značajnije smanjenje važnijih brasinosteroida: tifasterola, kastasterona i brasinolida u usporedbi s klijancima s mutantnim alelom *bril-5* uzgajanim pod istim uvjetima.¹²⁸ Konačno, protein BEN1 sadrži NAD(P)-veznu domenu, te stoga vjerojatno pripada obitelji oksido-reduktaza. Nadalje, najbliži je paralog dihidroflavonol-4-reduktaze i antocijanidin-reduktaze, enzima uključenih u biosintezu flavonoida što upućuje na potencijalnu regulacijsku ulogu proteina BEN1 u metabolizmu brasinosteroida preko flavonoida. Kao drugu mogućnost funkcionalnog djelovanja proteina BEN1, autori su predložili da bi protein BEN1 mogao biti steroidna reduktaza koja sudjeluje u razgradnji brasinosteroidnih hormona. Brasinosteroidi kao polihidroksilirani derivati sterola imaju ključnu ulogu u regulaciji biljnog rasta i razvoja. Zajedno s apscizinskom kiselinom, auksinima, giberelinima, citokininima, jasmonatima, salicilnom kiselinom i etilenom čine zajednicu biljnih hormona, a po kemijskoj prirodi najbližini su steroidnim hormonima kod životinja. Clouse¹³⁷ u svom revijalnom radu navodi kako brasinosteroidi u biljci *A. thaliana* omogućuju rast biljne stanice među ostalim regulirajući sintezu i aktivnost enzima koji modificiraju staničnu stijenu (poput ksiloglukan endotransglikozilaze / hidrolaze, glukanaze, ekspanzina, saharoza-sintaze i celuloza-sintaze). Potiču staničnu diobu, diferencijaciju stanica, cvjetanje i kao takvi imaju esencijalnu ulogu u moderiranju staničnog odgovora na stres.

U ovom radu *in vitro* analiza potvrde interakcije proteina BEN1 i SerRS napravljena je prvotno SPR metodom za proteinski par BEN1 i SerRS-His uz određivanje konstante disocijacije ($K_d = 1,03 \times 10^{-6} (\pm 1,67 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$), a potom i MST metodom u kombinaciji proteina BEN1 i SerRS uz određivanje konstante disocijacije ($K_d = 4,45 \times 10^{-7} (\pm 1,40 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$). Uzimajući u obzir da se radi o dvije različite biofizičke metodologije istraživanja proteinskih interakcija (u SPR metodi protein mamac je imobiliziran na matriksu čipa, dok se u MST metodi proteini nalaze slobodni u otopini) veliko poklapanje vrijednosti konstante disocijacije (razlika oko 2 puta) unutar raspona vrijednosti biološke značajnosti predstavlja vrlo zadovoljavajući rezultat. MST mjerenja za cjelovite i skraćene verzije BEN1 i SerRS trebale su dati odgovor po pitanju identifikacije proteinskih

domena odgovornih za interakciju. Protein BEN1 u svojoj primarnoj sekvenci sadrži regiju bogatu kiselim i polarnim aminokiselinskim ostacima na N-kraju proteina koji prema računalnim predikcijama trodimenzionalne strukture izgleda kao "stršeća" nit koja ulazi u globularnu srž. S druge strane protein SerRS posjeduje bazičan i polaran C-terminalni dio koji bi mogao uspostavljati elektrostatske interakcije s drugim nabijenim regijama u svojoj okolini, pa prema tome i s nabijenom N-terminalnom regijom BEN1 proteina. Važnost C-kraja SerRS enzima za uspostavu proteinskih interakcija ranije je već istražena u kvasca *S. cerevisiae*⁵⁵ na kompleksu peroksina Pex21p i SerRS-a, gdje je uklanjanje 13 krajnjih aminokiselina SerRS proteina potpuno dokinulo interakciju SerRS-a s peroksinom. Upravo suprotno, u ovom radu MST eksperimenti s cjelovitim proteinom BEN1 i skraćenom varijantom proteina SerRS kojemu nedostaje zadnjih 9 aminokiselina (bazična regija) C-kraja dokazali su uspostavu proteinske interakcije bez obzira radi li se o SerRS proteinskoj varijanti s (His)₆-privjeskom ($K_d = 6,49 \times 10^{-7} (\pm 1,64 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$) ili bez njega ($K_d = 4,04 \times 10^{-7} (\pm 1,19 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$). Ovo ukazuje kako uklanjanje krajnjih aminokiselinskih ostataka C-kraja SerRS nema utjecaja na interakciju. Također, uklanjanje bazične regije C-kraja SerRS nije utjecalo na stabilnost proteina u vidu smanjenja ekspresije ili topljivosti skraćene varijante proteina u odnosu na cjeloviti SerRS što je u slaganju s ranije provedenim istraživanjem proteinske stabilnosti kvašćeve SerRS kojoj je uklonjeno krajnjih 13 aminokiselina na C-kraju, odnosno kukuruzne SerRS kojoj je uklonjeno 18 krajnjih aminokiselina na C-kraju.⁵⁷ MST analiza smjese samostalne N-terminalne domene SerRS (NSerRS) i proteina BEN1 nije potvrdila proteinsku interakciju što zajedno s prethodnim opažanjima upućuje na zaključak kako se interakcijska domena na SerRS proteinu ne nalazi niti na C-, niti na N-kraju, već u središnjem dijelu proteina - katalitičkoj domeni. Ovo svakako u budućnosti treba dalje potvrditi detaljnijim biofizičkim eksperimentima. Budući da u ovom radu nisu uspješno proizvedene skraćene varijante proteina SerRS u obliku katalitičke domene sa skraćenim, odnosno s cijelim C-krajem, jer je zbog nepoznavanja točne trodimenzionalne strukture proteina vjerojatno došlo do nepovoljnog skraćivanja cjelovitog proteina, te izostanka steričke stabilizacije prilikom ekspresije i smatanja proteina, buduće skraćene varijante treba redizajnirati kako bi se ostvarila optimalna genska ekspresija i proteinski prinos. S druge strane MST analiza proteinskog para Δ N17BEN1 (uklonjena regija na N-kraju bogata kiselim i polarnim aminokiselinama) i SerRS nije pokazala uspostavu proteinske interakcije. Ovo jasno upućuje kako protein BEN1 uspostavlja interakciju sa SerRS koristeći

se svojim N-terminalnim produžetkom. Isto tako, u budućnosti je potrebna detaljnija funkcionalna karakterizacija proteinske interakcije BEN1 i SerRS kako bi se rasvijetlila potencijalno nova nekanonska uloga SerRS. RT-qPCR analiza koja je krenula u smjeru rasvijetljavanja povezanosti ovih proteina u biljci *A. thaliana* već na genskoj razini, pokazala je kako ekspresija gena *ben1* nije ovisna o ekspresiji gena *serS* bez obzira radi li se o biljkama divljeg tipa ili transgeničnim biljkama koje nadeksprimiraju SerRS-TAP protein, odnosno biljkama koje su rasle na hranjivim podlogama bez stresa ili s dodanim stresorima, što upućuje kako niti na proteinskoj razini njihove koncentracije u stanici nisu međusobno zavisne. Moguće je spekulirati kako se BEN1:SerRS kompleks uspostavlja pri uvjetima koji su još uvijek nepoznati, ali moguće povezani s regulacijom metabolizma brasinosteroida tek u, za biljnu stanicu, neuobičajnim situacijama (primjerice stanjima stresa) uzimajući u obzir da brasinosteroidi u stanici obavljaju mnoštvo funkcija, među ostalim sudjeluju i u moderiranju staničnog odgovora na stres.¹²⁹

Rezultati spektrometrije masa nakon TAP-MS metode ponudili su niz potencijalnih interakcijskih partnera citosolne SerRS iz biljke *A. thaliana* između kojih su odabrana četiri za daljnje biofizičke analize. Translacijski elongacijski faktor EF2 pojavio se samo u prvoj TAP-MS pretrazi, no odabran je stoga što je ranije SPR metodom dokazana interakcija SerRS metanogenog tipa iz arheje *M. thermoautotrophicus* s EF-G proteinom iz prokariota, inače homologom eukariotskog EF2 proteina (V. Godinić-Mikulčić, neobjavljeni rezultati). PNF kao protein nepoznate funkcije za čiju ekspresiju je bilo pokazano da se inducira dodatkom aluminija bio je zanimljiv izbor s obzirom da je slično povećanje ekspresije dodavanjem teških metala zabilježeno i kod SerRS-a iz biljke *A. thaliana* u prisutnosti kadmija.⁹ Ribosomski protein RPL9-1 pronađen je u dvije uzastopne TAP-MS pretrage, osim toga, homolog RPL9-1, protein L6 interagira s atipičnom SerRS iz metanogene arheje.⁴⁹ GST protein odabran je zbog otprije poznate činjenice da su GST proteini uključeni u stanični odgovor na stres. Kako je već ranije diskutirano, zbog niza eksperimentalnih poteškoća, vjerodostojnost interakcija SerRS-a i ovdje spomenutih proteina još uvijek nije niti potvrđena, niti opovrgnuta. U slučaju konstrukta EF2 potrebno je optimizirati kloniranje promjenom vektorskog sustava ili metodologije kloniranja, za protein RPL9-1 pak treba optimizirati topljivost. U slučaju proteina GST i PNF, korištenje prikladnije metodologije kojom je

moгуće zaobići probleme agregiranja proteina u mjernim kapilarama instrumenta za provođenje MST-a, poput fluorimetrije ili SPR metode, moglo bi riješiti postojeće probleme.

5.3. Lokalizacija citosolne SerRS u biljnoj stanici

Neke nekanonske uloge određenih citosolnih aaRS zahtijevaju njihovu lokalizaciju u jezgri što je omogućeno posjedovanjem specifičnih nuklearnih lokalizacijskih sekvenci (NLS) u primarnoj strukturi. Iako vrlo heterogeni, mnogi NLS-ovi pokazuju zajedničku karakteristiku nagomilavanja jako pozitivno nabijenih aminokiselinskih ostataka,¹³⁰ što vjerojatno ima funkcionalni značaj u prepoznavanju između NLS-ova i transportnih molekula koje sudjeluju u prijenosu kroz jezgrinu ovojnicu. Najbolje opisani su jednodijelni i dvodijelni (bipartitni) motivi, iako postoje i drugi.¹³¹ Poznato je kako humana citosolna SerRS ulazi u jezgru gdje regulira aktivnost gena *vefga* sudjelujući na taj način u funkcionalnoj regulaciji opće vaskularizacije organizma. Ovaj protein u aditivnoj dodatnoj UNE-S na svom C-kraju sadrži specifični NLS koji obiluje nabijenim aminokiselinama pri fiziološkom pH s bazičnim lizinom u najvećem udjelu (**KKQKKQHEGSKKK**). Osim kod humane SerRS, visoko homologan NLS na C-kraju citosolnih SerRS enzima utvrđen je i kod ostalih predstavnika kralješnjaka od riba do ljudi.⁵ Kao što je ranije diskutirano, sličan aminokiselinski slijed bogat lizinima (TFLPFKAKPVVADTKGKKSKA) sadrži i citosolna SerRS iz biljke *A. thaliana* na svome C-kraju, a ovakav redoslijed lizina pak vrlo sliči redoslijedu lizina u bipartitnom NLS kod proteina *VirE2 NSE2* iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (FEEFERAIKTKYGS DTEIKLKS KSGIMHDSK)¹³² što svakako podupire pretpostavku da C-kraj SerRS iz *A. thaliana* sadrži NLS koji ga uvodi u jezgru. Prvotna mikroskopijska analiza konstrukta C24 nedvojbeno je potvrdila ulazak konstrukta GFP-C24 u jezgru stanica pokožice luka. Ove stanice je relativno jednostavno analizirati u jednom sloju, što nije slučaj s biljnim dijelovima homolognog sustava biljke *A. thaliana* što svakako utječe na kvalitetu signala. Problem rada s ovako relativno malim proteinskim konstruktima (GFP $M_r \sim 27\,000$, C24 iz C-kraja SerRS dugačak je 21 aminokiselinu, $\sim 2\,300$ Da) očituje se u činjenici da proteini relativne molekulske mase manje od 40 kDa ulaze u staničnu jezgru bez posredstva transportnih molekula, te je teško odrediti djeluje li C24 kao funkcionalni NLS ili ne. Ovaj problem riješen je fuzijom GFP-a i cjelovitog SerRS smještanjem GFP privjeska na N-kraj

SerRS kako bi se C-kraj s potencijalnim NLS-om održao slobodnim za eventualnu interakciju s transportnim molekulama prilikom ulaska u jezgru. Kasnije je napravljena i fuzija SerRS s GFP privjeskom na C-kraju kako bi se ispitala i ovakva varijanta proteina. Sudeći prema fluorescencijskim mikroskopskim analizama stanica luka s tranzijentnom ekspresijom GFP fuzijskih konstrukata, C-kraj SerRS pokazuje slab potencijal kao NLS, ako uopće ikakav. Naime, signal GFP-a u jezgri detektiran je tek u 10 - 20 % analiziranih stanica, dok u ostatku nije zabilježen. Identičan rezultat zabilježen je i kod značajno preciznije konfokalne analize kako stanica pokožice luka, tako i protoplasta iz biljke *A. thaliana* koji tranzijentno eksprimiraju fuzijske konstrukte GFP-a i SerRS. Pojavljivanje signala GFP-a fuzijskog proteina u jezgri u tako rijetkom broju slučajeva moguća je posljedica dvaju scenarija: u prvom dolazi do ulaska SerRS proteina u jezgru tek u rijetkim okolnostima - primjerice u stresnim stanjima, dok drugi scenarij pretpostavlja eventualno proteolitičko odcjepljivanje GFP-privjeska na C-kraju SerRS ili preuranjenu terminaciju translacije u slučaju GFP-a na N-kraju proteina čime nastaje slobodni GFP koji može samostalno ući u jezgru i izazvati pozitivan odziv fluorescencije. Prvoj hipotezi svakako pridonosi obrazac ponašanja već detektiran i istražen kod humane TyrRS¹³³ koja u oksidacijskom stresu posredstvom angiogenina ulazi u jezgru gdje djelujući na transkripcijski faktor E2F1 regulira ekspresiju gena (BRCA1 i RAD51) koji kodiraju za proteine koji popravljaju oštećenja molekule DNA. Zaštitno djelovanje TyrRS zabilježeno je i u organizmu *D. rerio*, gdje nadekspresija TyrRS štiti od dvostrukih lomova DNA izazvanih UV zračenjem, budući da se nakon blokiranja transporta TyrRS u jezgru, broj dvostrukih lomova DNA značajno povećao. Zanimljivo je kako u ovom radu konfokalna analiza transgeničnih biljaka *A. thaliana* koje konstitutivno nadeksprimiraju GFP-SerRS protein, a uzgajane su na hranjivim podlogama bez stresora, nije dokazala prisutnost GFP-SerRS proteina u jezgri što podupire hipotezu kako u normalnim fiziološkim stanjima citosolna SerRS ne ulazi u jezgru. Nadalje, *western-hibridizacijska* analiza jezgrinih proteina izoliranih iz transgenične biljke koja eksprimira SerRS-TAP koristeći antitijela na TAP privjesak (J. Rokov Plavec, neobjavljeni rezultati), nije pokazala prisutnost proteina SerRS u jezgri. Uzimajući u obzir mali postotak stanica pokožice luka i protoplasta koji su uslijed tranzijentne ekspresije fuzija GFP i SerRS proteina pokazivali signal u jezgri, te potpuni izostanak signala u jezgri u slučaju konstitutivne ekspresije u transgeničnim biljkama, hipoteza kako citosolni SerRS iz *A. thaliana* ulazi u jezgru samo u neuobičajnim fiziološkim stanjima, poput različitih stanja stresa (a fiziološki disbalans bi

mogao biti izazvan i samim mehaničkim oštećivanjem stanica tijekom bombardiranja česticama zlata uslijed transformacije), čini se kao razumno objašnjenje. Svakako, ovakav zaključak bi trebalo dalje provjeriti izlažući transgenične biljke s konstitutivnom ekspresijom SerRS i GFP fuzija različitim stresorima uz praćenje lokalizacije SerRS u takvim slučajevima.

5.4. Stresni utjecaj okoline i SerRS

Iako se utjecaj abiotičkih stresora na biljni organizam istražuje već niz godina, malo je dostupnih podataka o utjecaju ovih stresora na aaRS, posebice SerRS, stoga je ovaj rad osobito značajan u rasvjetljavanju uloge aaRS u abiotičkom stresu biljaka. Morfološka analiza dvije linije transgeničnih biljaka u odnosu na divlji tip pokazuje relativno malu, ali još uvijek statistički značajnu razliku u apsolutnoj duljini korijena bilo jedne ili obje linije transgeničnih biljaka u odnosu na divlji tip kod određenih koncentracija ionskih (100 mmol dm^{-3} NaCl, 50 mmol dm^{-3} KCl) i osmotskih stresora (150 mmol dm^{-3} manitol), odnosno stresa izazvanog teškim metalima ($100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ CdCl_2). Uzrok poboljšanom rastu korijena klijanaca transgeničnih linija u odnosu na divlji tip može biti ili posljedica aktivne uljučenosti SerRS u biljni odgovor na stres ili pak nespecifična hiperaktivacija translacije uslijed nadekspresije SerRS u biljnom organizmu što bi se posljedično moglo reflektirati u pojačanoj aktivnosti i rastu biljnog organizma. Kako bi se detaljnije rasvijetlila povezanost SerRS i morfoloških razlika, odnosno utvrdilo ima li uopće SerRS utjecaj na biljni organizam u stanju stresa, pristupilo se analizi ekspresije gena *serS* u biljkama divljeg tipa koje su uzgajane na podlogama sa i bez ionskih (NaCl, KCl) i osmotskih (manitol) stresora, te su planirane dodatne analize ekspresije i u transgeničnim biljkama koje za sada nisu provedene. Provedene analize nisu ukazale na značajne razlike ekspresiji gena *serS* bez obzira jesu li biljke rasle na podlozi sa ili bez stresora što svakako treba dodatno potvrditi drugačijim eksperimentalnim pristupom. Ukoliko SerRS i sudjeluje u odgovoru na stres, on to moguće postiže ulazeći u interakcije s drugim molekulama u stanici (npr. s proteinom BEN1) ili povećavajući sintezu alarmona (Ap_nA) u stanici. Tako je primjerice zanimljivo primjetiti kako se u potrazi za promjenom ekspresije gena koji kodiraju za translacijski aparat u biljci *A. thaliana*¹³⁴ u solnom stresu izazvanom 150 mmol dm^{-3} NaCl kao jedan od gena čija je aktivnost bila povećana pojavio gen koji kodira za ribosomski protein L9-1, isti protein za koji je u ovom

radu TAP-MS metodom *in vivo* utvrđena interakcija sa SerRS. Zanimljivo je nadalje, što su biljke u spomenutom radu prvotno uzgajane na hranjivim podlogama bez stresora, da bi klijanci nakon 16 dana bili presađeni na podloge sa 150 mmol dm^{-3} NaCl gdje su izlagane djelovanju stresora kroz različite vremenske periode (2, 4, 6, 8 i 24 sata). Naime, jedan od mogućih razloga izostanka vidljive razlike u aktivnosti gena *serS* na podlogama sa stresorima u našem radu možebitno leži u primjenjenoj metodologiji. U ovom radu sjeme biljke *A. thaliana* je direktno nasađeno na hranjive podloge s već prethodno dodanim abiotičkim stresorima, te su klijanci kroz 7 dana rasli na takvim podlogama kontinuirano izloženi djelovanju stresora prije nego je provedena izolacija mRNA i RT-qPCR analiza što je pak moglo ostaviti dovoljno vremena adaptacijskim mehanizmima kojima se utjecaj stresora na biljni organizam smanjio. Također, ukoliko je djelovanje SerRS u navednim stresovima akutne prirode, utjecaj SerRS se do trenutka analize mogao potpuno izgubiti. Kako bi se ispitala i ova mogućnost, u budućim eksperimentima bi trebalo koristiti metodologiju uzgoja koja podrazumijeva prvotno nasađivanje sjemena na podloge bez stresora, a potom nakon što klijanci dosegnu određen stadij razvoja, presađiti ih na podloge s prethodno dodanim stresorima. Konačno, ovakvu metodologiju su primjenjivali i Sarry i suradnici (2009)⁹ u radu u kojemu su pokazali utjecaj kadmija na koncentraciju proteina SerRS u biljci *A. thaliana*.

Dakle, moguće je da zaista dolazi do nadekspresije gena *serS* u stresu, ali to nije bilo moguće vidjeti zbog prirode primjenjivane metode. Također je moguće da SerRS čini proteinske komplekse i na taj način nekanonski sudjeluje u moderiranju odgovora na stres. Kao što je pokazano, SerRS ulazi u kompleks s proteinom BEN1 koji pak sudjeluje u metabolizmu za stanicu izuzetno važnih hormona - brasinosteroida. Poznato je da brasinosteroidi sudjeluju u oblikovanju staničnog odgovora na stres, pa je otvorena mogućnost spekulaciji kako i SerRS preko proteina BEN1 dolazi u indirektnu vezu s brasinosteroidnim metabolizmom, odnosno moderiranju stresnog odgovora. Međutim, svakako ne treba isključiti niti mogućnost da SerRS u stresu sudjeluje i kroz sintezu poliadenozinskih spojeva (Ap_nA) što bi još jednom moglo objasniti izostanak vidljive nadekspresije gena *serS*. Iako u literaturi ovakvo ponašanje SerRS nije dokumentirano (najviše podataka o biosintezi alarmona vezano je uz LysRS), ovo je mogućnost koju tek treba eksperimentalno provjeriti.

§ 6. ZAKLJUČAK

- (His)₆-privjesak na C-kraju SerRS dovodi do strukturne i funkcionalne stabilizacije ovog proteina, dok SerRS bez (His)₆-privjeska pokazuje tendenciju monomerizacije uz smanjenu kinetičku aktivnost.
- SerRS-His pokazuje *in vitro* gotovo jednak afinitet prema heterolognim supstratima tRNA^{Ser} iz bakterije *E.coli* ($k_{\text{cat}}/K_M = 0,18 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$) i kvasca *S. cerevisiae* ($k_{\text{cat}}/K_M = 0,13 \text{ s}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$) što je uz SerRS iz kukuruza jedini primjer SerRS koja jednako efikasno prepoznaje bakterijsku i eukariotsku tRNA^{Ser}.
- SerRS, kao i SerRS-His uspostavljaju kompleks s metaboličkim proteinom BEN1 ($K_d(\text{SerRS-His}) = 1,03 \times 10^{-6} (\pm 1,67 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$, $K_d(\text{SerRS}) = 4,45 \times 10^{-7} (\pm 1,40 \times 10^{-7}) \text{ mol dm}^{-3}$) koji direktno ili indirektno sudjeluje u regulaciji koncentracije brainosteroida, hormona uključenih u niz funkcija u stanici, među ostalim i u stanični odgovor na stres.
- Za uspostavu kompleksa SerRS:BEN1 nije nužna N-terminalna domena (tRNA vezna domena), kao niti 9 posljednjih aminokiselina (bazična regija) C-kraja SerRS-a. S druge strane, N-terminalni produžetak proteina BEN1 od presudne je važnosti za interakciju. Interakcija između proteina BEN1 i SerRS se uspostavlja preko N-terminalnog produžetka BEN1 proteina i vjerojatno globularne katalitičke domene SerRS.
- Aktivnost gena *serS* i *ben1* međusobno je nezavisna, iako je u transgeničnim biljkama *A. thaliana* koje nadeksprimiraju SerRS-TAP aktivnost *ben1* gena snižena.
- Uslijed tranzijentne ekspresije fuzije SerRS i GFP-a (na N- ili C- kraju) do pojave signala GFP u jezgri dolazi u stanicama luka *A. cepa*, odnosno protoplastima *A. thaliana* u 10 - 20 % slučajeva, dok uslijed konstitutivne ekspresije GFP-SerRS proteina u transgeničnoj biljci *A. thaliana* signal u jezgri nije dokumentiran što upućuje kako signal u jezgri

potječe ili od samostalnog GFP-a ili od fuzijskog proteina koji je u jezgru ušao pod posebni okolnostima (primjerice, stresnim uvjetima).

- Relativno mala, ali statistički značajna razlika u apsolutnoj duljini korijena zabilježena je kod transgeničnih biljaka *A. thaliana* koje nadeksprimiraju SerRS-TAP na podlogama sa 100 mmol dm^{-3} NaCl, 50 mmol dm^{-3} KCl, 150 mmol dm^{-3} manitolom i $100 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ CdCl₂ u odnosu na biljke divljeg tipa.
- Nije utvrđena razlika u ekspresijskoj aktivnosti *serS* gena biljaka divljeg tipa *A. thaliana* na podlogama s dodanim 50 mmol dm^{-3} NaCl, odnosno 100 mmol dm^{-3} manitolom što upućuje kako u zadanim eksperimentalnim okolnostima solni i osmotski stres direktno ne utječu na ekspresiju gena *serS*.

§ 7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

aa-AMP - aminoacil-adenilat
aaRS - aminoacil-tRNA-sintetaza
AMP - adenzin-5'-monofosfat
ATP - adenzin-5'-trifosfat
DTT - ditiotreitol
DNA - deoksiribonukleinska kiselina
EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina
GFP - zeleni fluorescentni protein (eng. *green fluorescent protein*)
GST - glutation-S-transferaza
IPTG - izopropil- β -D-tioglaktopiranozid
 k_{cat} - obrtni broj
 K_d - konstanta disocijacije
 K_m - konstanta Michaelis-Menten
mRNA - glasnička ribonukleinska kiselina
MST- mikrotermoforeza (eng. *microscale thermophoresis*)
Ni-NTA - nikal(II)-nitrilotrioctena kiselina
PAGE - elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
PDB- proteinska banka podataka (eng. *protein data bank*)
PCR - lančana reakcija polimeraze
 PP_i - pirofosfat
RNA - ribonukleinska kiselina
SPR - metoda rezonancije površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*)
TAP-MS- tandemsko afinitetno sutaloženje spregnuto spektrometrijom masa (eng. *tandem affinity purification-mass spectrometry*)
tRNA - prijenosna ribonukleinska kiselina
qPCR - kvantitativna lančana reakcija polimeraze (eng. *quantitative polymerase chain reaction*)
w / V – masena koncentracija

Popis dvadeset standardnih aminokiselina i odgovarajuće troslovne, odnosno jednoslovne kratice

alanin, Ala (A)
arginin, Arg (R)
asparagin, Asn (N)
asparaginska kiselina, Asp (D)
cistein, Cys (C)
glutamin, Gln (Q)
glutamat, Glu (E)
glicin, Gly (G)
histidin, His (H)
izoleucin, Ile (I)

leucin, Leu (L)
lizin, Lys (K)
metionin, Met (M)
fenilalanin, Phe (F)
prolin, Pro (P)
serin, Ser (S)
treonin, Thr (T)
triptofan, Trp (W)
tirozin, Tyr (Y)
valin (V)

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. S. G. Park, K. L. Ewalt, S. Kim, *Trends Biochem. Sci.* **30** (2005) 569-574.
2. M. Guo, XL Yang, P. Schimmel, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11** (2010) 668-674.
3. A. Azad, D. R. Stanford, S. Sarkar, A. K. Hopper, *Mol. Biol. Cell* **12** (2001) 1381-1392.
4. Y. Ko, Y. Kang, E. Kim, S. G. Park, S. Kim, *J. Cell Biol.* **149** (2000) 567-574.
5. X. Xu, Y. Shi, H. Zhang, E. C. Swindell, A. G. Marshall, M. Guo, S. Kishi, X. Yang, *Nat. Commun.* (2012) 3:681. doi: 10.1038/ncomms1686.
6. L. L. Kisselev, J. Justesen, D. A. Wolfson, L. Y. Frolova, *FEBS Lett.* **427** (1998) 157-163.
7. I. Ivanov, V. Lesauskaite, L. Ivanoviene, I. Sadauskiene, R. Gaileviciute, D. Karciauskaite, H. Rodovicius, *Medicina (Kaunas)* **41** (2005) 47-53.
8. A. Giritch, A. Herbig, HJ. Balzer, M. Ganai, U. W. Stephan, H. Baumlein, *Eur. J. Biochem.* **244** (1997) 310-317.
9. J. E. Sarry, L. Kuhn, C. Duxruix, A. Lafaye, C. Junot, V. Hugovieux, A. Jourdain, O. Batien, JB. Fievet, D. Valihen, B. Amekraz, C. Moulin, E. Ezan, J. Garin, J. Bourguignon, *Proteomics* **6** (2006) 2180-2198.
10. M. Ibba, D. Söll, *Annu Rev Biochem.* **69** (2000).
11. S. Cusak, C. Berthet-Colominas, M. Hartlein, N. Nassar, R. Leberman, *Nature* **347** (1990) 249-255.
12. G. Eriani, M. Delarue, O. Poch, J. Gangloff, D. Moras, *Nature* **347** (1990) 203-206.
13. M. Ibba, S. Morgan, A. W. Curnow, D. R. Pridmore, U. C. Vothknecht, W. Gardner, W. Lin, C. R. Woese, D. Söll, *Science* **278** (1997) 1119-1122.
14. C. R. Woese, G. J. Olsen, M. Ibba, D. Söll, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64** (2000) 202-236.
15. M. Ibba, H. C. Losey, Y. Kawarabayasi, H. Kikuchi, S. Bunjun, D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (1999) 418-423.
16. C. D. Hausmann, M. Ibba, *FEMS Microbiol. Rev.* **32** (2008) 705-721.
17. P. J. Beuning, K. Musier-Forsyth, *Biopolymers* **52** (1999) 1-28.
18. A. R. Fersht, *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **212** (1981) 351-379.

19. O. M. Howard, H. F. Dong, D. Yang, N. Raben, K. Nagaraju, A. Rosen, L. Casciola-Rosen, M. Härtlein, M. Korn, D. Yang, K. Yiadom, S. Dwivedi, P. H. Plotz, J. Oppenheim, *J. Exp. Med.* **196** (2002) 781-791.
20. S. J. Park, S. H. Kim, H. S. Choi, Y. Rhee, S. K. Lim, *Bone* **45** (2009) 994-1003.
21. T. A. Kleeman, D. Wei, K. L. Simpson, E. A. First, *J. Biol. Chem.* **272** (1997) 14420-14425.
22. K. Wakasugi, P. Schimmel, *Science* **284** (1999) 147-151.
23. A. B. Tolstrup, A. Bejder, J. Fleckner, J. Justesen, *J. Biol. Chem.* **270** (1995) 397-403.
24. K. Wakasugi, B. M. Slike, J. Hood, A. Otani, K. L. Ewalt, M. Friedlander, D. A. Cheresch, P. Schimmel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002) 173-177.
25. H. Fukui, R. Hanaoka, A. Kawahara, *Circ. Res.* **104** (2009) 1253-1259.
26. W. Herzog, K. Muller, J. Huiskens, D. Y. Stanier, *Circ. Res.* **104** (2009) 1260-1266.
27. S. Commans, A. Böck, *FEMS Microbiol. Rev.* **23** (1999) 335-351.
28. H. Belrhali, A. Yaremchuk, M. Tukalo, K. Larsen, C. Berthet-Colominas, R. Leberman, B. Beijer, B. Sproat, J. Als-Nielsen, G. Grubel, J. F. Legrand, M. Lehmann, S. Cusack, *Science* **263** (1994) 1432-1436.
29. F. Borel, C. Vincent, R. Leberman, M. Härtlein, *Nucleic Acid Res.* **22** (1994) 2963-2969.
30. J. R. Sampson, M. E. Saks, *Nucleic Acid Res.* **21** (1993) 4467-4475.
31. M. Helm, H. Brulé, D. Friede, R. Giegé, D. Putz, C. Florentz, *RNA* **6** (2000) 1359-1379.
32. V. Biou, A. Yaremchuk, M. Tukalo, S. Cusack, *Science* **263** (1994) 1404-1410.
33. S. Cusack, A. Yaremchuk, M. Tukalo, *EMBO J.* **15** (1996) 2834-2842.
34. S. Price, S. Cusack, F. Borel, C. Berthet-Colominas, R. Leberman, *FEBS Lett.* **324** (1993) 167-170.
35. I. Gruić-Sovulj, I. Landeka, D. Söll, I. Weygand-Đurašević, *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 5271-5279.
36. D. Korenčić, I. Ahel, D. Söll, *Food Technol. Biotechnol.* **40** (2002) 255-260.
37. D. Tumbula, U. C. Vothknecht, J. Li, Pelachier, C. Stathopoulos, H. Becker, D. Söll, *Genetics* **152** (1999) 1269-1276.
38. C. J. Bult, O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. Fitzgerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. F.

- Tomb, M. D. Adams, C. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Goldek, J. L. Scott, N. S. M. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrmann, D. Nguyen, T. R. Utterback, J. M. Kelley, J. D. Peterson, P. W. Sadow, M. C. Hanna, M. D. Cotton, K. M. Roberts, M. A. Hurst, B. P. Kaine, M. Borodovsky, Hp. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese, J. C. Venter, *Science* **273** (1996) 1058-1073.
39. HS. Kim, U. C. Vothknecht, R. Hedderich, I. Čelić, D. Söll, *J. Bacteriol.* **180** (1998) 6446-6449.
40. D. Korenčić, C. Polycarpo, I. Weygand-Đurašević, D. Söll, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 48780-48786.
41. D. Ahel, D. Slade, M. Močibob, D. Söll, *FEBS Lett.* **579** (2005) 4344-4348.
42. S. Bilokapić, T. Maier, D. Ahel, I. Gruić-Sovulj, I. Weygand-Đurašević, *EMBO J.* **25** (2006) 2498-2509.
43. M. Fujinaga, C. Berthet-Colominas, A. D. Yaremchuk, M. A. Tukalo, S. Cusak, *J. Mol. Biol.* **234** (1993) 222-233.
44. S. Chimnaronk, M. Gravers Jeppesen, T. Suzuki, J. Nyborg, K. Watanabe, *EMBO J.* **24** (2005) 3369-3379.
45. M. Praetorius-Ibba, C. D. Hausmann, M. Paras, T. E. Rogers, M. Ibba, *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 3680-3687.
46. M. Praetorius-Ibba, T. E. Rogers, R. Samson, Z. Kelman, M. Ibba, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 26099-26104.
47. C. D. Hausmann, M. Praetorius-Ibba, M. Ibba, *Nucleic Acid Res.* **35** (2007) 6094-6102.
48. V. Godinić-Mikulčić, J. Jarić, C. D. Hausmann, M. Ibba, I. Weygand-Đurašević, *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 3396-3404.
49. V. Godinić-Mikulčić, J. Jarić, B. J. Greber, V. Franke, V. Hodnik, G. Anderluh, N. Ban, I. Weygand-Đurašević, *Nucleic Acid Res.* **42** (2014) 5191-5201.
50. G. Simos, A. Sergef, F. Fasiolo, K. Hellmuth, A. Shevchenko, M. Mann, E. Hurt, *EMBO J.* **15** (1996) 5437-5448.
51. G. Simos, A. Sauer, F. Fasiolo, E. Hurt, *Moll. Cell* **1** (1998) 235-242.

52. E. Karanasios, H. Simader, G. Panayotou, D. Suck, G. Simos, *J. Mol. Biol.* **374** (2007) 1077-1090.
53. J. S. Graindorge, B. Senger, D. Tritch, G. Simos, F. Fasiolo, *Biochemistry* **44** (2005) 1344-1352.
54. S. Ročak, I. Landeka, I. Weygand-Đurašević, *FEMS Microbiol. Lett.* **214** (2002) 101-106.
55. V. Godinić, M. Močibob, S. Ročak, M. Ibba, I. Weygand-Đurašević, *FEBS J.* **274** (2007) 2788-2799.
56. M. Močibob, I. Weygand-Đurašević, *Arch. Biochem. Biophys.* **470** (2008) 129-138.
57. S. An, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 42359-42362.
58. S. An, K. Musier-Forsyth, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 34465-34472.
59. B. Ruan, D. Söll, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 25887-25891.
60. K. Sheppard, J. Yuan, M. J. Hohn, B. Jester, K. M. Devine, D. Söll, *Nucleic Acid Res.* **36** (2008) 1813-1825.
61. H. D. Becker, D. Kern, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (1998) 12832-12837.
62. D. Tumbula-Hansen, L. Feng, H. Toogood, K. O. Stetter, D. Söll, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 37184-37190.
63. B. Min, M. Kitabatake, C. Polycarpo, J. Pelaschier, G. Raczniak, B. Ruan, H. Kobayashi, S. Namgoong, D. Söll, *J. Bacteriol.* **185** (2003) 3524-3526.
64. A. M. Cardoso, C. Polycarpo, O. B. Martinis, D. Söll, *RNA Biol.* **3** (2006) 110-114.
65. M. Bailly, M. Blaise, B. Lorber, H. D. Becker, D. Kern, *Moll. Cell* **28** (2007) 228-239.
66. A. W. Curnow, D. Tumbula, J. T. Pelaschier, B. Min, D. Söll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (1998) 12838-12843.
67. G. Raczniak, H. D. Becker, Min B., D. Söll, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 45862-45867.
68. J. C. Salazar, R. Zúñiga, G. Raczniak, H. Becker, D. Söll, *FEBS Lett.* **500** (2001) 129-131.
69. H. Oshikane, K. Sheppard, S. Fukai, Y. Nakamura, R. Ishitani, T. Numata, R. L. Sherrer, L. Feng, E. Schmitt, M. Panvert, S. Blanquet, Y. Mechulam, D. Söll, O. Nureki, *Science* **312** (2006) 1950-1954.
70. Y. Goldgur, M. Safro, *Biochem Mol. Biol. Intl.* **32** (1994) 1075-1083.
71. R. S. A. Lipman, J. Chen, C. Evilia, O. Vitseva, Y.M. Hou, *Biochemistry* **42** (2003) 7487-7496

72. A. K. Bandyopadhyay, M. P. Deutscher, *J. Mol. Biol.* **60** (1971) 113-122
73. S. Quevillon, J.C. Robinson, E. Berthonneau, M. Siatecka, M. Mirande, *J. Mol. Biol.* **285** (1999) 183-195.
74. J. C. Robinson, P. Kerjan, M. Mirande, *J. Mol. Biol.* **304** (2000) 983-994.
75. M. Raina, S. Elgamal, T. J. Santangelo, M. Ibba, *FEBS Lett.* **586** (2012) 2232-2238.
76. A. Motzig, H. Nechushtan, S. Y. Foo, E. Razin, *Trends Mol. Med.* **19** (2013) 726-731.
77. G. Bec, P. Kerjan, J. P. Walter, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 2086-2092.
78. A.M. Duchêne, C. Pujol, L. Maréchal-Drouard, *Curr. Genet.* **55** (2009) 1-18.
79. S. D. Putney, P. Schimmel, *Nature* **291** (1981) 632-635.
80. Y.G. Ko, Y.S. Kang, E.K. Kim, S. G. Park, S. Kim, *J. Cell. Biol.* **149** (2000) 567-574.
81. K. Galani, H. Grosshans, K. Deinert, E. C. Hurt, G. Simos, *EMBO J.* **20** (2001) 6889-6898.
82. E. Lund, J. E. Dahlberg, *Science* **282** (1998) 2082-2085.
83. S. Sarkar, A. K. Azad, A. K. Hopper, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (1999) 14366-13471.
84. A. K. Azad, D. R. Stanford, S. Sarkar, A. K. Hopper, *Mol. Biol. Cell* **12** (2001) 1381-1392.
85. X. Xu, Y. Shi, H. M. Zhang, E. C. Swindell, A. G. Marshall, M. Guo, S. Kishi, X.L. Yang, *Nat Commun.* (2012) 3:681. doi: 10.1038/ncomms1686.
86. W. Larcher, *Physiological Plant Ecology*, 4th edn. Springer, Berlin, 2003.
87. L. L. Kisselev, J. Justesen, A. D. Wolfson, L. Y. Frolova, *FEBS Lett.* **427** (1998) 157-163.
88. M. Pietrowska-Borek, K. Nuc, M. Zielezińska, A. Guranowski, *FEBS Open Bio.* (2011) 1:1-6. doi: 10.1016/j.fob.2011.10.002.
89. H. Jakubowski, *Acta Biochem. Pol.* **30** (1983) 51-69.
90. J. Kováčik, B. Klejdus, J. Hedbavny, J. Zoň, *J. Plant Physiol.* **168** (2011) 576-584.
91. Y. Gogorcena, I. Iturbe-Ormaetxe, P. R. Escuredo, M. Becana, *Plant Physiol.* **108** (1995) 753-759.
92. R. L. Clark, F. C. Neidhardt, *J. Bacteriol.* **172** (1990) 3237-3243.
93. E. W. Hickey, I. N. Hirshfield, *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (1990) 1038-1045.
94. F. Lévêque, M. Gazeau, M. Fromant, S. Blanquet, P. Plateau, *J. Bacteriol.* **173** (1991) 7903-7910.

95. M. Wright, N. Boonyalai, J. A. Tanner, A. D. Hindley, A. D. Miller, *FEBS J.* **273** (2006) 3534-3544.
96. M. Wright, M. A. Azhar, A. Kamal, A. D. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24** (2014) 2346-2352.
97. pET System Manual, 11. izdanje, Novagen (Merck), 2007.
98. <http://www.lifetechnologies.com> (preuzeto 11.11.2015.)
99. <https://www.merckmillipore.com> (preuzeto 11.11.2015.)
100. <https://www.gelifesciences.com> (preuzeto 11.11.2015.)
101. www.clontech.com (preuzeto 11.11.2015.)
102. www.agilent.com (preuzeto 11.11.2015.)
103. <https://gateway.psb.ugent.be/> (preuzeto 11.11.2015.)
104. J. Sambrook i D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. izdanje, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
105. www.nanodrop.com (preuzeto 11.11.2015.)
106. <http://www.lifetechnologies.com/hr/en/home/brands/product-brand/dynal/dynabeads-technology.html> (preuzeto 11.11.2015.)
107. P. M. Burgers, K. J. Percival *Anal. Biochem.* **163** (1987) 391-397.
108. <http://lifescience.roche.com/shop/products/lightcycler-taqman-master> (preuzeto 11.11.2015.)
109. www.qiagen.com (preuzeto 11.11.2015.)
110. O. Puig, F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, B. Séraphin, *Methods* **24** (2001) 218-229.
111. C. J. Fee, *Methods Mol. Biol.* **996** (2013) 287-312.
112. <http://www.nanotemper-technologies.com/> (preuzeto 11.11.2015.)
113. C. C. Chen, J. K. Hwang, J. M. Yang *Nucleic Acid Res.* **34** (2006) 152-157.
114. C. C. Chen, J. K. Hwang, J. M. Yang *BMC Bioinformatics* (2009) 10:366.
115. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5443.pdf (preuzeto 11.11.2015.)
116. L. A. Huber, *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **4** (2003) 74-80.
117. www.neb.com (preuzeto 11.11.2015.)
118. J. Klose, N. Wendt, S. Kubald, E. Krause, K. Fechner, M. Beyermann, M. Bienert, R. Rudolph, S. Rothmund, *Prot. Sci.* **13** (2004) 2470-2475.

119. A. Chant, C. M. Kraemer-Pecore, R. Watkin, G. G. Kneale, *Prot. Exp. Pur.* **39** (2005) 152-159.
120. Y. Tajika, N. Sakai, T. Tamura, M. Yao, N. Watanabe, I. Tanaka, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* **57** (2004) 862-865.
121. S. Bilokapić, D. Korenčić, D. Söll, I. Weygand-Đurašević, *Eur. J. Biochem.* **271** (2004) 694-702.
122. S. Lesjak, I. Weygand-Đurašević, *FEMS Microbiol Lett.* **294** (2009) 111-118.
123. I. Weygand-Đurašević, N. Ban, D. Jahn, D. Söll, *Eur. J. Biochem.* **214** (1993) 869-877.
124. J. Rokov Plavec, S. Lesjak, I. Gruić Sovulj, M. Močibob, M. Dulić, I. Weygand-Đurašević, *Arch. Biochem. Biophys.* **529** (2013) 122-130.
125. J. Rokov, D. Söll, I. Weygand-Đurašević, *Plant Mol. Biol.* **38** (1998) 497-502.
126. A. Soma, H. Himeno, *Nucleic Acid Res.* **26** (1998) 4374-4381.
127. M. M. Brandao, M. C. Silva-Filho, *Mol. Biol. Evol.* **28** (2011) 79-85.
128. T. Yuan, S. Fujioka, S. Takatsuto, S. Matsumoto, X. Gou, K. He, S. D. Russel, J. Li, *The Plant J.* **51** (2007) 220-233.
129. Q. Fariduddin, M. Yusuf, I. Ahmad, A. Ahmad, *Biologia Plantarum* **58** (2014) 9-17.
130. B. Tinland, Z. Koukolikova-Nicola, M. N. Hall, B. Hohn *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** (1992) 7442-7446.
131. C. Murat, N. Rajesh, R. Burkhard *EMBO Reports* **1** (2000) 411-415.
132. V. Citovsky, D. Warnick, P. Zambryski *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** (1994) 3210-3214.
133. N. Wei, Y. Shi, L. N. Truong, K. M. Fisch, T. Xu, E. Gardiner, G. Fu, YS. O. Hsu, S. Kishi, A. I. Su, X. Wu, XL. Yang, *Mol Cell* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.09.006>
134. M. A. Omidbakhshfard, N. Omranian, F. S. Ahmadi, Z. Nikoloski, B. Mueller-Roeber, *Plant Signaling & Behaviour* **7** (2012) 1095-1102.
135. G. Fu, T. Xu, Y. Shi, N. Wei, XL. Yang, *J Biol. Chem.* **287** (2012) 9330-9334.
136. J. Sheen, *Plant Physiol.* **127** (2001) 1466-1475
137. S. D. Clouse, *The Arabidopsis book* (2011) 2-28

§ 9. ŽIVOTOPIS

Mario Kekez rođen je 31.01.1982. u Zagrebu gdje je završio osnovnu školu i III opću gimnaziju. 2000. godine upisuje profesorski smjer biologije i kemije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje 2006. brani diplomski rad na Zavodu za animalnu fiziologiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Nadice Oršolić i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Vesne Benković. 2009. godine upisuje doktorski studij, smjer biokemija, na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Njegovo radno iskustvo je vrlo heterogeno: neposredno nakon diplome kao vanjski stručni suradnik vodi vježbe u mikrobiološkom praktikumu za studente molekularne biologije na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kod dr. sc. Jasne Hrenović, zatim 2007. godine predaje kemiju u osnovnoj školi Medvedgrad i gimnaziji Lucijana Vranjanina, potom radi na molekularno patološkoj dijagnostici u Laboratoriju za molekularnu patologiju Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu kod prof. dr. sc. Svena Seiwertha, vodeći također vježbe iz patologije za studente medicine, odnosno kao vanjski stručni suradnik Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu za studente laboratorijsko-medicinske dijagnostike. Konačno, zahvaljujući prof. dr. sc. Ivani Weygand-Đurašević, 2009. godine dobiva mjesto stručnog suradnika na Zavodu za biokemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje i danas radi znanstveno se baveći biokemijskom problematikom biljne seril-tRNA-sintetaze pod mentorstvom dr. sc. Jasmine Rokov Plavec, odnosno, gdje sudjeluje u nastavi biokemijskih kolegija za studente kemijskih i bioloških profila. Neposredni je voditelj tri diplomski rada. Boravio je na nekoliko stručnih i znanstvenih usavršavanja u inozemstvu: dva tjedna 2008. godine u Bonnu na *Institut für Pathologie Bonn-Duisdorf* kod dr. sc. Magdolne Bollmann, dva tjedna 2013. godine na Biotehničkom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani kod prof. dr. sc. Gregora Anderluha i Vesne Hodnik, tjedan dana 2014. godine na *Academy and University Center Nove Hrad* u Češkoj na FEBS-ovoj školi *Ligand-binding theory and practice*, te 3 mjeseca 2014. godine u Strasbourgu na *Institut de biologie moléculaire des plantes* kod dr. sc. Anne-Marie Duchêne.

Znanstvene publikacije

M. Kekez, N. Bauer, E. Saric, J. Rokov-Plavec, Exclusive cytosolic localization and broad

tRNA^{Ser} specificity of *Arabidopsis thaliana* seryl-tRNA synthetase, *J. Plant Biol.* (prihvačeno za objavljevanje)

Sudjelovanja na konferencijama i školama (posterska priopćenja)

1. Kekez, Mario; Zanki, Vladimir; Hodnik, Vesna; Anderluh, Gregor; Duchêne, Anne-Marie; Rokov Plavec, Jasmina: Pinpointing the interaction domains of plant seryl-tRNA synthetase and metabolic protein BEN1; 2015, Portorož, Slovenija
2. Kekez, Mario; Zanki, Vladimir; Hodnik, Vesna; Anderluh, Gregor; Rokov Plavec, Jasmina: Plant seryl-tRNA synthetase and metabolic protein BEN1: identification of interaction surfaces by biophysical methods; 2015, Zagreb, Hrvatska
3. Kekez, Mario; Rokov Plavec, Jasmina; Bauer, Nataša; Razdorov, Genadij; Hodnik, Vesna; Anderluh, Gregor; Weygand-Đurašević, Ivana: *In vivo* and *in vitro* analysis of plant seryl-tRNA synthetase interactome; 2014, Zadar, Hrvatska
4. Kekez, Mario; Rokov-Plavec, Jasmina; Hodnik, Vesna; Anderluh, Gregor; Weygand-Đurašević, Ivana: Interaction of plant seryl-tRNA synthetase and BEN1, protein involved in brassinosteroid metabolism; 2014, Nove Hrade, Češka republika
5. Rokov Plavec, Jasmina; Kekez, Mario; Bauer, Nataša; Šarić, Ela; Weygand-Đurašević, Ivana: *Arabidopsis thaliana* seryl-tRNA synthetase participates in cellular stress response; 2014, Zadar, Hrvatska
6. Pulić, Ivana; Salamina, Marco; Cendron, Laura; Zanotti, Giuseppe; Kekez, Mario; Matković-Čalogović, Dubravka: Cloning, purification and crystallization of FlgD and CrdA – *Helicobacter pylori* survival required proteins; 2013, Rehovot, Izrael
7. Pulić, Ivana; Cendron, Laura; Kekez, Mario; Zanotti, Giuseppe; Matković-Čalogović, Dubravka: Characterization of CrdA-the copper homeostasis factor from bacterium *Helicobacter pylori*; 2015, Zagreb, Hrvatska